GeneXpert®
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert® EV

REF GXEV-100N-10

Cepheid®

In Vitro Diagnostic Medical Device

CE IVD

300-5052 Rev. G, October 2009

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
Tel: (408) 541-4191
Fax: (408) 541-4192
Technical Support toll-free: (888) 838-3222

EC REP
Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont - France
Tel: +33 5 63 82 53 00
Fax: +33 5 63 82 53 01
Technical Support: +33 5 63 82 53 19

English

In Vitro Diagnostic Medical Device

Proprietary Name

Xpert® EV

Common or Usual Name

Xpert EV Assay

Intended Use

The Cepheid® Xpert EV assay is a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the GeneXpert® Dx System for the presumptive qualitative detection of enterovirus (EV) RNA in cerebrospinal fluid (CSF) specimens from individuals with signs and symptoms of meningitis. This test, in conjunction with other laboratory results and clinical information, may be used as an aid in the laboratory diagnosis of enterovirus infection in patients with a clinical suspicion of meningitis or meningoencephalitis. Assay performance characteristics have not been established for immunocompromised or immunosuppressed patients.

CAUTION: The results obtained with the Xpert EV assay should be used only as an adjunct to clinical observations and other information available to the physician. Positive Xpert EV results do not rule out other causes of meningitis, including bacteria, mycobacteria, other viruses (e.g., herpes family viruses, arboviruses, mumps virus, etc.), and fungi.

Summary and Explanation

The Cepheid® Xpert EV assay is a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay used to detect enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) specimens. Enterovirus is taxonomically classified as those viruses consisting of polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and enteroviruses.[3] Enteroviruses cause a wide range of infections and are most often spread through direct contact with respiratory secretions of an infected person.[1] The common symptoms are fever, severe headache, stiff neck, bright lights hurting the eyes, drowsiness or confusion, and nausea and vomiting. In infants, the symptoms include fever, fretfulness or irritability, difficulty in awakening or loss of appetite.[1] While most infections are either asymptomatic or result in minor febrile illnesses, they often result in hospitalization, especially of infants and children. About 90% of viral meningitis cases are caused by enteroviruses;[2] and enteroviruses are the most common cause of meningitis in the United States, with an estimated 30 000 to 50 000 hospitalizations each year.[3] Enteroviral meningitis usually self-resolves within 7-10 days. However, non-viral causes of meningitis, for example bacterial meningitis, can be serious and may result in disability or death if not treated promptly, therefore meningitis should be taken seriously.[1]

An enterovirus test, together with clinical observation and other clinical information, can help physicians identify patients with enteroviral meningitis to aid in patient management.[4]

Principle of the Procedure

The GeneXpert® Dx System automates and integrates sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in simple or complex samples using real-time PCR and RT-PCR assays. The system consists of an instrument, personal computer, and preloaded software for running tests on collected samples and viewing the results. The system requires the use of Xpert single-use disposable GeneXpert® cartridges that hold the PCR reagents and host the PCR process. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination between samples is eliminated. For a full description of the system, see the *GeneXpert® Dx System Operator Manual*.

The Xpert EV assay is designed to detect enterovirus (EV) RNA (enterovirus genome 5' untranslated region [UTR] between nucleotide 452 and 596) in CSF samples. The assay includes reagents, primers, and probes for the simultaneous detection of nucleic acid from the target EV and the sample-processing control/internal control (SPC/IC). The assay includes the SPC/IC to verify adequate processing of the target virus and monitors the presence of inhibitors in the RT-PCR assay to avoid a false negative result. (Note that in the GeneXpert® Dx System software, CIC is the name for the SPC/IC.) The assay also includes a probe check control to verify reagent rehydration, probe integrity, and reaction-tube filling in the cartridge.

To run a test, the CSF sample and four reagents are transferred into designated chambers of the Xpert EV cartridge. The GeneXpert® Dx System performs sample preparation by lysing the virus and SPC (encapsidated RNA pseudovirus), binding the RNA to the capture matrix, and eluting the RNA. The RNA is mixed with dry RT reagents and transferred into the reaction tube for preparation of cDNA. The cDNA is then mixed with dry PCR reagents and transferred into the reaction tube for real-time PCR and detection. The EV primers and probe amplify and detect a consensus region of the enterovirus 5' untranslated region (UTR). The test takes approximately 2.5 hours.

Reagents and Instruments

Material Provided

The Xpert EV assay kit (GXEV-100N-10) contains sufficient reagents to process 10 samples. The kit contains the following:

Xpert EV Cartridges	**10 cartridges/kit**
Bead 1 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
• Reverse transcriptase	
• RNase Inhibitor	
• dNTPs	
• BSA (bovine serum albumin)	
Bead 2 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
• Reverse Oligonucleotide Primers	
• BSA (bovine serum albumin)	
Bead 3 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
• DNA Polymerase	
• dNTPs	
• BSA (bovine serum albumin)	
Bead 4 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
• Forward Oligonucleotide Primers	
• Fluorescently labeled Oligonucleotide Probes	
• BSA (bovine serum albumin)	
Bead 5 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
• Sample processing control (encapsidated CIC RNA pseudovirus)	
• BSA (bovine serum albumin)	
Binding Reagent (1)	**10 × 1 mL**
• Ethanol	
• Water	
Wash Reagent (2)	**10 × 3.2 mL**
• Cysteamine HCl	
• EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	
• KCl	
• MTG (monothioglycerol)	
• PEG (polyethyleneglycol)	
• Tris, pH 7.0	
• Tween-20	
• Water	

Elution Reagent (3)	**10 × 2.0 mL**

- Ammonium sulfate
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
- Tris, pH 7.0
- Water

Lysis Reagent (4)	**10 × 300 µL**

- N-acetyl-L-cysteine
- Guanidine thiocyanate
- N-lauroylsarcosine
- Sodium citrate, pH 6.8
- Water

Notes:

- Material Safety Data Sheets (MSDS) for all reagents provided in this assay are available upon request from Cepheid Technical Support.
- The bovine serum albumin (BSA) in this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Storage and Handling

- Store the Xpert EV cartridges and reagents at 2-28 °C.
- Do not open a cartridge until you are ready to perform testing.
- Use the cartridge and reagents within 30 minutes after opening the package.
- Do not use cartridges or reagents that have passed the expiration date.
- Do not use any reagents that have become cloudy or discolored.

Materials Required but Not Provided

- GeneXpert® Dx System (catalog number varies by configuration): GeneXpert® instrument, computer, barcode scanner, and Operator Manual
- Printer (See *GeneXpert® Dx System Operator Manual* for compatibility guidelines)
- Xpert EV Assay CD (Part No. 950-0125)
- 200-µL pipette
- Sterile 200-µL pipette tips

Warnings and Precautions

- For *In Vitro* Diagnostic Use Only.
- Lysis Reagent contains guanidine thiocyanate, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing this reagent is spilled, clean the area with laboratory detergent and water.
- Treat all biological specimens, including cartridges, as if they are capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all human specimens should be treated with universal precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention[5] and the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards).[6]
- Dispose of all hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution. Discard all materials in a safe and acceptable manner, and in compliance with all federal, state, and local requirements.

Specimen Collection and Transport

Collect CSF in a sterile container and transport to the laboratory according to standard operating procedure at your institution. Keep specimens at 2-8 °C until testing or freeze specimens if test will not be performed within 72 hours of collection. Do not freeze and thaw the specimens more than two times. Centrifugation of the specimen is not recommended.

Procedure

Cautions

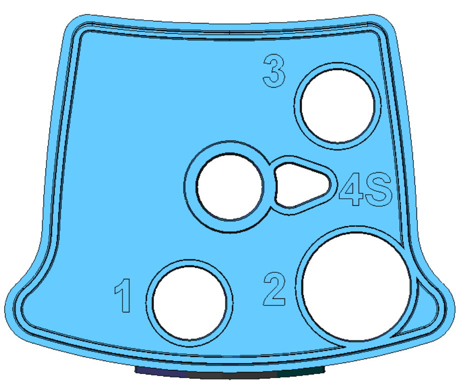
- Do not substitute Xpert EV reagents with other reagents.
- Do not open the Xpert EV cartridge lid except when adding sample and reagents.
- Do not load a Xpert EV cartridge that has been dropped or shaken after you have inserted the sample and reagents.
- Do not load a cartridge that has a damaged reaction tube.
- Do not open used Xpert EV cartridges.
- Do not reuse spent Xpert EV cartridges.
- Do not freeze and thaw the specimens more than two times.
- Do not use specimens that have been centrifuged.

Preparing the Cartridge

To add the sample and reagents into the cartridge (Figure 1):

1. Remove a cartridge and the reagents from the package.
2. Open the Binding Reagent (1) ampule by twisting and breaking off the cap.
3. Insert the tip of the Binding Reagent (1) ampule into cartridge chamber 1 and squeeze the ampule until the entire content is emptied.
4. Open the Wash Reagent (2) ampule by twisting and breaking off the cap.
5. Insert the tip of the Wash Reagent (2) ampule into cartridge chamber 2 and squeeze the ampule until the entire content is emptied.
6. Open the Elution Reagent (3) ampule by twisting and breaking off the cap.
7. Insert the tip of the Elution Reagent (3) ampule into cartridge chamber 3 and squeeze the ampule until the entire content is emptied.
8. Using the 200-µL pipette, add 140 µL of the Lysis Reagent (4) to cartridge chamber 4S. Discard the Lysis Reagent (4) vial.
9. Using the 200-µL pipette, add 140 µL of the sample to cartridge chamber 4S. To prevent large air bubbles from forming, be sure to hold the pipette tip at the top of the chamber and dispense the sample slowly.
10. Close the cartridge lid.

Important: Be sure to load the cartridge into the GeneXpert® Dx instrument and start the test within 30 minutes of adding the reagents.



1 = Binding Reagent
2 = W ash Reagent
3 = Elution Reagent
4S = Lysis Reagent and Sample

Figure 1. Xpert EV cartridge (top view).

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert EV assay definition is imported into the software (see the instructions provided with the assay CD). If you do not have the Xpert EV assay CD, contact Cepheid Technical Support.

This section lists the basic steps of running the test. For detailed instructions, see the *GeneXpert® Dx System Operator Manual.*

1. Turn on the computer, and then turn on the GeneXpert® Dx instrument.
2. On the Windows® desktop, double-click the GeneXpert® Dx shortcut icon.
3. Log on to the GeneXpert® Dx System software using your user name and password.
4. In the GeneXpert® Dx System window, click **Create Test.** The Scan Cartridge Barcode dialog box appears.
5. Scan the bar code on the Xpert EV cartridge. The **Create Test** window appears. Using the bar code information, the software automatically fills the following boxes: **Select Assay**, **Reagent Lot ID**, **Cartridge S/N**, and **Expiration Date**.
6. In the **Sample ID** box, scan or type the sample ID. Make sure you type the correct sample ID. The sample ID is associated with the test results and is shown in the **View Results** window and all the reports.
7. Click **Start Test.** In the dialog box that appears, type your password.
8. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
9. Close the module door. Be sure the green light is solid green.
10. When the test is finished, the instrument module light turns off.
11. Wait until the system releases the door lock before opening the module door and removing the cartridge.
12. Follow your laboratory safety guidelines for discarding the cartridge.

Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert® Dx System Operator Manual.*

CONTROL Quality Control

Quality control requirements must be performed in conformance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures.

Each test includes two internal controls to validate the assay: Sample-processing control/internal control and probe check. Test samples are controlled according to the following procedures:

- **Sample-processing control/internal control (SPC/IC)—**The SPC/IC is an encapsidated RNA pseudovirus in the form of a dry bead and is included in each cartridge. The SPC/IC verifies adequate lysis of target EV and sample processing, and detects assay interference.

  It is mixed with the sample to control for adequate sample processing and to monitor the integrity of the RT-PCR assay. The SPC/IC is considered to pass if it meets the validated acceptance criteria. Note that in the GeneXpert® Dx System software, CIC is the name for the SPC/IC.

- **Probe check—**Before the start of the PCR reaction, the system performs a probe check on both the EV target and the SPC/IC to verify reagent bead rehydration and reaction-tube filling. Each probe check is considered to pass if it meets the validated acceptance criteria.
- **External Controls—**External controls must be used for training, proficiency testing and external QC of the GeneXpert® Dx System. External controls should be used in accordance with local, state, and federal accrediting organizations as applicable. External Controls can be prepared by diluting Coxsackievirus A9 strain Bozek or Coxsackievirus A6 strain C.G. (Gdula) with known negative patient CSF or Synthetic CSF (e.g. SeraCare Life Sciences Inc. Catalog number HSP-515) to approximately 10 - 1000 TCID$_{50}$/mL that gives an EV C_t range of 32 - 35 for the Xpert EV assay.

Interpretation of Results

The results are available in the GeneXpert® Dx System—View Results window. Possible results are described in this section.

Note: In the GeneXpert® Dx System **View Results** window, the SPC/IC is displayed as CIC in the **Analyte Name** column.

CAUTION: The results obtained with the Xpert EV assay should be used only as an adjunct to clinical observation and other information available to the physician. Positive Xpert EV results do not rule out other causes of meningitis, including bacteria, mycobacteria, other viruses (e.g. herpes family viruses, arboviruses, mumps virus, etc) and fungi.

POSITIVE (Figure 2)

EV target nucleic acid is detected (GeneXpert® Dx System—**View Results** window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.):

- EV—POS
- CIC (SPC/IC)—NA (When EV titer is high, the RT-PCR for the SPC might be suppressed.)
- Probe Check—PASS
- **Positive Xpert EV results do not rule out other causes of meningitis, including bacteria, mycobacteria, other viruses (e.g. herpes family viruses, arboviruses, mumps virus, etc) and fungi.**

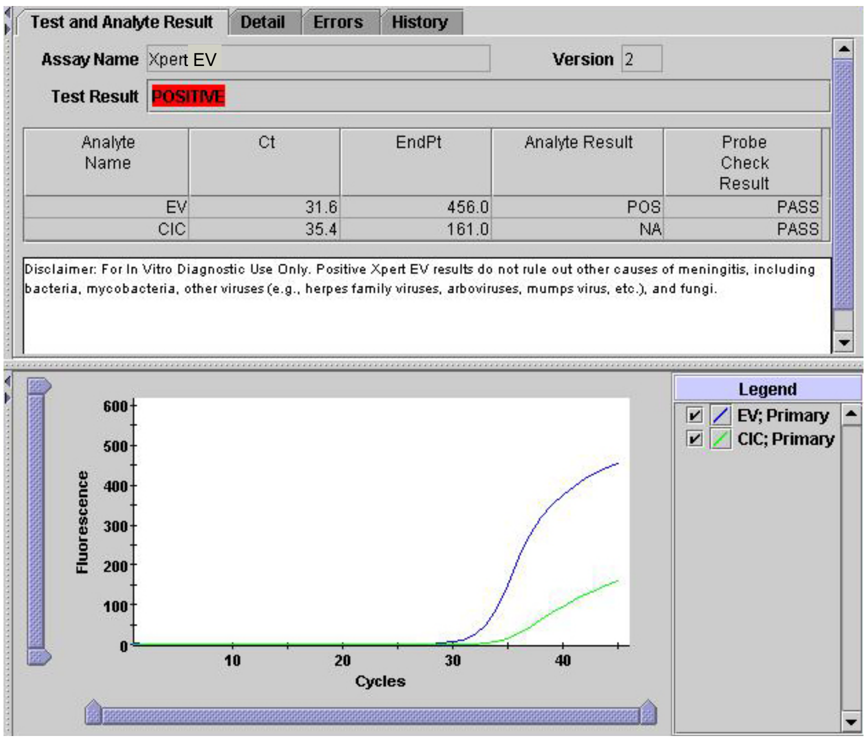


Figure 2. Positive Result (GeneXpert® Dx System—**View Results** Window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.)

NEGATIVE (Figure 3)

EV target nucleic acid is not detected, but SPC meets acceptance criteria (GeneXpert® Dx System—**View Results** window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.):

- EV—NEG
- CIC (SPC/IC)—PASS
- Probe Check—PASS
- **Negative Xpert EV results do not rule out enterovirus as causes of meningitis but that enterovirus was not detected.**

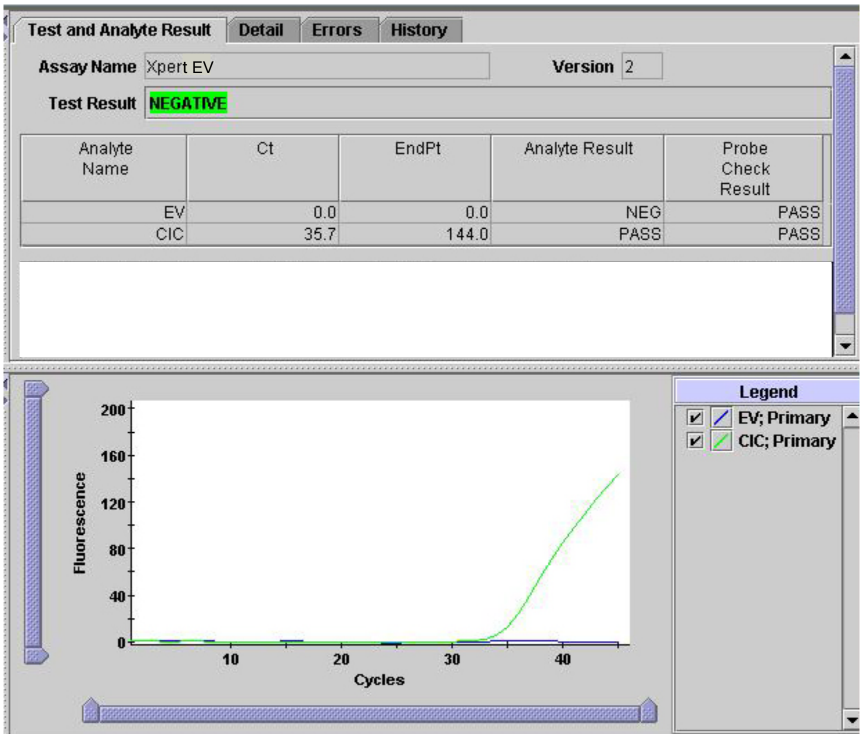


Figure 3. Negative Result (GeneXpert® Dx System—**View Results** Window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.)

INVALID (Figure 4)

The presence or absence of EV target nucleic acid cannot be determined, repeat test with extra specimen. SPC/IC does not meet acceptance criteria, the sample was not properly processed, or PCR is inhibited (GeneXpert® Dx System—**View Results** window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.):

- EV—INVALID
- CIC (SPC/IC)—FAIL
- Probe Check—PASS

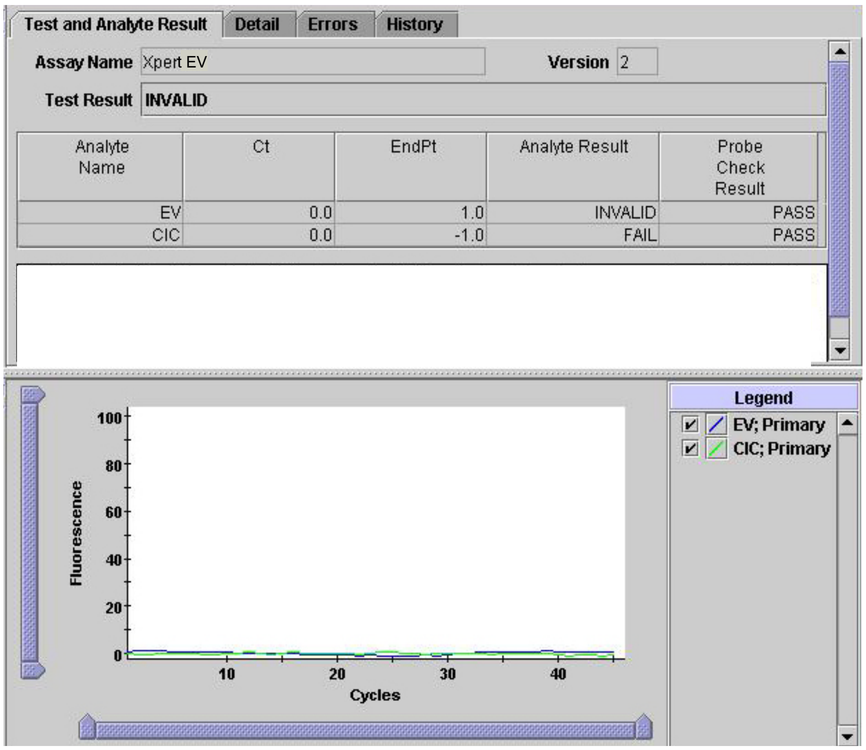


Figure 4. Invalid Result (GeneXpert® Dx System—**View Results** Window. Note that the SPC/IC is displayed as CIC.)

ERROR

The presence or absence of EV target nucleic acid cannot be determined, repeat test with extra specimen. The Probe Check control failed probably due to the reaction tube being filled improperly, a probe integrity problem was detected, or the assay aborted:

- EV—NO RESULT
- CIC (SPC/IC)—NO RESULT
- Probe Check—FAIL

NO RESULT

The presence or absence of EV target nucleic acid cannot be determined, repeat test with extra specimen. Insufficient data were collected to produce a test result (for example, the operator stopped a test that was in progress):

- EV—NO RESULT
- CIC (SPC/IC)—NO RESULT
- Probe Check—NA

Reasons to Repeat the Assay

Repeat the assay with fresh sample if the following results are generated:

- An INVALID result indicates that the controls SPC/IC failed. The sample was not properly processed or PCR is inhibited.
- An ERROR result indicates that the Probe Check control failed and the assay was aborted possibly due to the reaction tube being filled improperly, a reagent probe integrity problem was detected, or because the maximum pressure limits were exceeded.
- A NO RESULT indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress.

Limitations

- Results from the Xpert EV assay should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician. An Xpert EV assay positive result does not rule out the presence of another pathogen like bacteria in CSF. As with any molecular assay, false positive results are always a possibility. Rare occurrences of simultaneous mixed bacterial-viral meningitis have been reported in the literature.[7, 8, 9] The performance of the Xpert EV assay was validated using the procedures provided in this package insert and with the Cepheid GeneXpert® Dx System only. Modifications should not be made to these procedures as they might alter the performance of the test.
- The Xpert EV assay is for the detection of enterovirus only. Negative test results do not rule out the presence of enterovirus. This test does not rule out the possibility of Herpes-induced meningitis or fungal meningitis; additional testing is required to rule out these infections.

CAUTION: As with other diagnostic procedures, the results obtained with the Xpert EV Assay should be used only as an adjunct to clinical observation and other information available to the physician. Positive Xpert EV results do not rule out other causes of meningitis, including bacteria, mycobacteria, other viruses (e.g. herpes family viruses, arboviruses, mumps virus, etc) and fungi.

Interfering Substances

Studies were conducted with potential interfering substances encountered in CSF. Substances tested were white blood cells, protein, whole blood and hemoglobin. WBC content was tested using leukocytes (K562 human leukemia cells) spiked into CSF.

To address potential interference from bloody taps, human CSF specimens contaminated with various levels (up to 125,000 RBC/mm^3) of blood were tested.

The concentration ranges and the interfering substances found in normal CSF are indicated in Table 1a. Also indicated are the potential ranges found in CSF during meningitis. Each substance was spiked at levels that could be encountered with normal or meningitis patients.

All tests were performed with CSF spiked with enterovirus serotype CVA9 at 80 $TCID_{50}$/mL (~3x LOD).

Table 1a. Samples of potentially interfering endogenous substances tested in Xpert EV.

Substance	Concentration range found in normal CSF	Potential CSF concentration range (during meningitis)	Sample tested with Xpert EV	Concentrations Tested
WBC	0–5 cells/mm^3	5–5000 cells/mm^3	K562 cells	Cells/mm^3: 0, 3.57, 35.7, 357, 7140
CSF Proteins	13–40 mg/dL	15–217 mg/dL	BSA: IgG (1:1 ratio)	Protein Concentration mg/dL 0, 30, 300, 1,071
Blood	None	Not applicable	14 bloody tap Human CSF	0% to approximately 2.5% v/v blood
Hemoglobin	12–18 g/dL RBC	Not applicable except in bloody taps	Hemoglobin (Ferrous powder) spiked into CSF	HgB g/dL 0, 0.36, 0.71, 2.14, 3.6 [Represents approximately v/v blood in CSF, respectively: 0%, 2.5%, 5%, 15%, 25%]

As indicated in Table 1b, positive enterovirus results were obtained even when the highest level of potentially interfering substance was introduced into the assay.

Table 1b. Results of study with potentially interfering endogenous substances tested in Xpert EV.

Interfering substance	Concentration	EV C_t
None (Control n = 8)	Not applicable	36.1
Protein (n = 4)	1071 mg / dL	38.2
WBC (n = 4)	7,140 cells / mm^3	37.2
Bloody tap, Specimen 1	2.5% v/v blood	35.9
Bloody tap, Specimen 2	2.5% v/v blood	35.0
Bloody tap, Specimen 3	2.5% v/v blood	35.3
Hemoglobin (n = 4)	3.6 g / dL	36.9

Performance Characteristics

Clinical Performance

Performance characteristics of the Xpert EV assay were determined in a multi-site investigational study at six institutions.

To be enrolled in the trial, a patient must have had a lumbar puncture because of meningitis symptoms, and an EV test and/or viral culture test ordered by the physician. The patient must have had sufficient excess CSF volume (greater than or equal to 0.5 mL) and have given written informed consent. Patient samples were excluded if the CSF for nucleic acid testing had been centrifuged or if the Xpert EV assay and assays for the clinical truth determination were not performed within the same freeze-thaw cycle of the specimen. Clinical history of the patients was also considered: clinical signs and symptoms; days since onset of symptoms; maximum temperature; contact history; CSF RBC, WBC, and differential; CSF glucose and total protein; CSF bacterial culture and gram stain; blood glucose; and viral culture from other specimens, if available.

A patient was defined as having EV meningitis (Clinical Diagnosis) if the following criteria were met: clinical evidence consistent with meningitis, laboratory results for CSF Gram stain, CSF bacterial culture, CSF glucose, CSF-blood glucose ratio, CSF total protein concentration, CSF leukocyte count, and either detection of an EV genome in CSF and/or positive CSF EV culture.

Initially 475 patients were submitted for enrollment. Forty-one patients did not meet the study inclusion criteria and were subsequently eliminated from the analysis leaving 434 analyzable subjects of which 255 had results from all the tests described above.

Table 2a. Prospective clinical samples evaluated against "Clinical Diagnosis"

A total of 199 eligible prospective patients were enrolled, 133 patients had the 6 laboratory results for the "clinical truth" evaluation. The clinical sensitivity and specificity for Xpert EV are shown in the table below.

		Clinical Diagnosis[1]	
		+	-
Xpert EV	+	26	3
	-	1	103
Totals		**27**	**106**

Clinical Sensitivity: 96.3% (26/27); 95% CI 81.0 – 99.9%
Clinical Specificity: 97.2% (103/106); 95% CI 91.9 – 99.4%

Table 2b. Banked prospectively collected clinical samples evaluated against "Clinical Diagnosis."

A total of 235 eligible retrospective patients were enrolled, 122 patients had the 6 laboratory results for the "clinical truth" evaluation. The clinical sensitivity and specificity for Xpert EV are shown in the table below.

		Clinical Diagnosis[1]	
		+	-
Xpert EV	+	23	3
	-	0	96
Totals		23	99

Clinical Sensitivity: 100% (23/23); 95% CI 85.2 – 100%
Clinical Specificity: 97.0% (96/99); 95% CI 91.4 – 99.4%

[1] A patient was defined as having EV meningitis (Clinical Diagnosis) if the following criteria were met: clinical evidence consistent with meningitis, laboratory results for CSF Gram stain, CSF bacterial culture, CSF glucose, CSF-blood glucose ratio, CSF total protein concentration, CSF leukocyte count, and detection of an EV genome in CSF or positive CSF EV culture.

Table 2c. Clinical performance of Xpert EV assay in reference to "Clinical Diagnosis" by age.

The 133 prospective and 122 banked prospectively collected clinical samples were each grouped by age. Clinical sensitivity and specificity of each age group are shown in the table below.

	Prospective Clinical Samples		Banked Prospectively Collected Clinical Samples	
Age	**Clinical Sensitivity**	**Clinical Specificity**	**Clinical Sensitivity**	**Clinical Specificity**
Neonatal (younger than 2 months)	100.0% (14/14)	96.0% (24/25)	100.0% (4/4)	90.0% (18/20)
Pediatrics (2 months to 17 years)	92.3% (12/13)	97.2%(69/71)	100.0 (14/14)	98.1% (51/52)
Adults (18 years and older)	(0/0)	100.0% (10/10)	100.0% (5/5)	100.0% (27/27)
Overall	96.3% (26/27)	97.2% (103/106)	100% (23/23)	97.0% (96/99)

Viral cultures were performed in 73.7% (320/434) of the eligible specimens; the remaining had insufficient CSF for culture. CSF samples from 263 subjects with sufficient excess volume were sent to a designated central laboratory for viral culture. In addition, viral cultures for 114 patient specimens were performed at the enrolling sites. Of these 114 subjects, 57 had viral cultures performed at both the enrolling sites and the central laboratory. Fifty-six of 57 subjects had concordant culture results, one subject had discrepant local and central culture results.

The central laboratory used Super E-Mix Shell Vials for viral culture and the cells were stained with pan enterovirus antibody. The cells that were positive for the pan enterovirus antibody were further stained with indirect immuno-fluorescence antibody for enterovirus identification. Each enrolling site used its own standard procedure for viral culture.

Table 3a. Prospective clinical samples evaluated against viral culture

Of the 199 eligible prospective specimens 131 had viral culture results. There were no discrepant results relative to enrolling sites and central laboratory viral culture testing. The positive and negative agreements between the Xpert EV and viral culture are shown in the table below.

		Viral Culture	
		+	-
Xpert EV	+	8	13
	-	0	110
Totals		8	123

Positive agreement: 100.0% (8/8) 95% CI 63.1–100.0%
Negative agreement: 89.4% (110/123) CI 82.65–94.3%

Table 3b. Banked prospectively collected clinical samples evaluated against viral culture

Of the 235 eligible retrospective specimens 211 had viral culture results. The positive and negative agreements between the Xpert EV and viral culture are shown in the table below.

		Viral Culture	
		+	-
Xpert EV	+	22	35
	-	1	153
Totals		23	188

Positive agreement: 95.7% (22/23) 95% CI 78.1–99.9%
Negative agreement: 81.4% (153/188) 95% CI 75.1–86.7%

Table 4. Expected values for Xpert EV in population with signs and symptoms consistent with meningitis

The 434 eligible patients are grouped by age and gender; the number and percentage of positive cases are calculated and shown in the table below.

		Xpert EV Result		
Age range (years)	Gender	**Positive n (%)**	**Negative n (%)**	**Total**
< 1	M	34 (29.3)	82 (70.7)	116
	F	26 (28.3)	66 (71.7)	92
1 – 5	M	8 (25.0)	24 (75.0)	32
	F	3 (11.1)	24 (88.9)	27
6 – 10	M	3 (31.4)	24 (68.6)	35
	F	3 (17.6)	14 (82.4)	17
11 – 15	M	8 (33.3)	16 (66.7)	24
	F	3 (15.0)	17 (85.0)	20
16 – 21	M	3 (20.0)	12 (80.0)	15
	F	3 (25.0)	9 (75.0)	12
>21	M	2 (10.0)	18 (90.0)	20
	F	3 (12.5)	21 (87.5)	24
Total		107 (24.7)	327 (75.3)	434

Analytical Reactivity/Enterovirus Serotype Testing

A total of 60 enterovirus serotypes were tested with the Xpert EV assay. Dilutions of the viral stock were run in replicates of 3 for each serotype at the presumed LOD. The dilutions were made in pooled EV negative human sample. The estimated analytical sensitivity is shown in Table 5 below.

Table 5. Estimated analytical sensitivity.

Sixty of the serotypes were tested and the estimated $TCID_{50}$/mL that these serotypes can be detected are shown in the table below.

Species	Serotype	Estimated $TCID_{50}$/mL
A	Coxsackie A3	5.01
A	Coxsackie A5	12.59
A	Coxsackie A6	12.59
A	Coxsackie A7	3.33
A	Coxsackie A10	2.81
A	Coxsackie A12	19.95
A	Coxsackie A14	0.10
A	Coxsackie A16	0.002
A	EV 71	0.16
B	Coxsackie A9	20.00
B	Coxsackie B1	4.00
B	Coxsackie B2	0.20
B	Coxsackie B3	0.028
B	Coxsackie B4	0.40
B	Coxsackie B5	0.04
B	Coxsackie B6	0.01
B	Echo 1	0.10
B	Echo 2	0.032
B	Echo 3	200.00
B	Echo 4	0.00032
B	Echo 5	0.032
B	Echo 6	200.00
B	Echo 7	2.00
B	Echo 8	0.10
B	Echo 9	2.00
B	Echo 11	40.00
B	Echo 12	1.58
B	Echo 13	0.01
B	Echo 14	0.0005
B	Echo 15	0.0032
B	Echo 16	0.0005
B	Echo 17	0.05
B	Echo 18	0.0002
B	Echo 19	2.51
B	Echo 20	0.032
B	Echo 21	1.00
B	Echo 24	0.02
B	Echo 25	0.50
B	Echo 26	0.032
B	Echo 27	0.00032
B	Echo 29	5.01
B	Echo 30	0.01
B	Echo 31	0.0032
B	Echo 32	0.10
B	Echo 33	0.05
B	EV 69	0.0002
C	Coxsackie A11	0.11
C	Coxsackie A13	13.27
C	Coxsackie A15	0.0032
C	Coxsackie A17	1.58
C	Coxsackie A18	0.02
C	Coxsackie A19	0.03
C	Coxsackie A20	0.002
C	Coxsackie A21	0.03
C	Coxsackie A22	0.02
C	Coxsackie A24	0.10
D	EV 68	199.53
D	EV 70	2.00
Poliovirus	Poliovirus 1 [1]	2.00
Poliovirus	Poliovirus 2 [1]	0.40
Poliovirus	Poliovirus 3 [1]	20.00

[1] **WARNING: When working with Polioviruses, ensure that appropriate biosafety-level containment procedures are followed.**

Analytical Specificity

The primer and probe sequences used in the Xpert EV assay do not detect nucleic acid extracted from the following organisms known to cause meningitis-like symptoms: EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, AdV-2, Measles, Mumps, Parainfluenza 1-3, Influenza A, Influenza B, VZV, CMV, Group B Streptococcus, *Haemophilus influenzae* B, *H. influenzae* non-B, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitides, Citrobacter freundii,* and *Citrobacter koseri,* nor did the Xpert EV assay generate any detectable amplicons when "whole organisms" of the listed pathogens were processed through the Xpert EV cartridge. The table below presents the organisms tested and the concentration for each organism tested.

Table 6. Analytical specificity for the Xpert EV assay.

Whole organisms were tested for specificity in the Xpert EV assay and the concentrations of the organisms tested are shown in the table below.

Organism	No. organisms/test
HHV-6	3.1×10^6 particles
HHV-7	1.4×10^7 particles
CMV	700 $TCID_{50}$
EBV	140 $TCID_{50}$
HSV-1	1.4×10^5 $TCID_{50}$
HSV-2	1.4×10^5 $TCID_{50}$
AdV-2	1.4×10^{12} $TCID_{50}$
Measles	700 $TCID_{50}$
Mumps	1.4×10^4 $TCID_{50}$
Parainfluenza 1	1.4×10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 2	7×10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 3	1.4×10^4 $TCID_{50}$
Influenza A	3.5×10^4 $TCID_{50}$
Influenza B	3.5×10^4 $TCID_{50}$
VZV	14 $TCID_{50}$
Group B Streptococcus	7×10^6 cells
H. influenzae B	7×10^6 cells
H. influenzae non-B	7×10^5 cells
E.coli	7×10^6 cells
N. meningitides	7×10^6 cells
C. freundii	7×10^6 cells
C. koseri	7×10^6 cells

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity, or limit of detection (LOD), is defined as the lowest concentration, or amount of an analyte that has been demonstrated by laboratory analysis to be reproducibly distinguished from a negative sample at a 95% confidence level. The dilutions were made in pooled EV negative human sample. For statistical confidence determination of the LOD, replicates of 20, along with 20 EV negative samples, were run. The samples run were Coxsackievirus A6 (CVA6), Coxsackievirus A9 (CVA9), Coxsackievirus A17 (CVA17), Enterovirus 70 (EV70) and Poliovirus 1 (PV1). Not all 63 serotypes were run in statistically significant numbers, since the primer and probe binding sites are conserved across all serotypes and the amplicon length is the same for all serotypes, so it would be expected that the amplification efficiency is the same for all serotypes. The five serotypes indicated above were selected to represent each of the enterovirus species CVA6 (A), CVA9 (B), CVA17 (C), EV70 (D) and PV1 (poliovirus).

Table 7. Limit of detection for five (5) serotypes.

The LOD of the five (5) serotypes, one from each of the enterovirus species are shown in the table below.

Serotype	Limit of Detection ($TCID_{50}$/mL)
CVA9	80.0
EV70	1.3
PV1	4.0
CVA17	1.0
CVA6	33.0

Reproducibility

Reproducibility was assessed in a multi-center, blinded study using a precision panel consisting of four specimens. Three sites tested each panel three times per day over 10 testing days, for a total of 90 results per panel specimen. The precision panel consisted of a negative sample and three positive samples, each with a specific EV serotype spiked into synthetic CSF at a concentration near the limit of detection.

Table 8. Summary of the first reproducibility study results.

The percent of agreement, the average Ct values for each concentration, the associated standard deviations, percent coefficient of variation for between day and between site for the multi-center reproducibility study are shown in the table below.

No. of specimens correctly classified					Between Day		Between Site		Total	
Serotype ($TCID_{50}$/mL)	Site 1	Site 2	Site 3	Mean EV Ct	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Negative	30/30	30/30	30/30							
CVA6 (134)	30/30	30/30	29/29[1]	35.0	0.343	0.98%	0.175	0.50%	1.101	3.15%
CVA9 (320)	30/30	30/30	30/30	34.4	0	0.00%	0	0.00%	0.61	1.77%
CVA17 (3)	30/30	30/30	29/29[1]	33.8	0	0.00%	0	0.00%	0.414	1.22%
Total Agreement	120/120	120/120	118/118							
% Agreement	100.00%	100.00%	100.00%							

[1] Two samples did not give any GeneXpert® result.

In order to further stress the system, a second study was performed. An internal reproducibility study was conducted over four different days on multiple GeneXpert® instruments (31) and ICORE modules (121). Two representative whole virus subtypes (i.e., Coxsackievirus CVA9 and Enterovirus EV70) were spiked into human negative CSF to create simulated specimens at both 2 x LOD and 4 x LOD. The negative sample was tested 20 times whereas two positive samples at the two concentrations were tested five (5) times per day. Of the total samples tested, there were two samples with "Invalid" and three samples with "No Result" by instrument software control definitions. Of the 157 reportable results, 155 were correctly classified.

Table 9. Summary of the second reproducibility study results.

The level of agreement, the average Ct values for each concentration, the associated standard deviations and percent coefficient of variation for each day are shown in the table below.

		Total Agreement—C_t Results					% Total
Specimen ID		**Day 1**	**Day 2**	**Day 3**	**Day 4**	**All Days**	**Agreement**
Negative	Total Agreement	20/20	18/18[1]	20/20	20/20	78/78	100%
	Average	NA	NA	NA	NA	NA	
	SD	NA	NA	NA	NA	NA	
	% CV	NA	NA	NA	NA	NA	
CA9 2X LOD	Total Agreement	4/5[2]	5/5	4/5[2]	5/5	18/20	90%
	Average	36.65	36.54	36.53	36.54	36.56	
	SD	0.56	0.46	0.21	0.69	0.48	
	% CV	1.53%	1.26%	0.57%	1.89%	1.31%	
CA9 4X LOD	Total Agreement	5/5	5/5	5/5	4/4[3]	19/19	100%
	Average	34.98	35.56	35.52	35.03	35.28	
	SD	0.53	0.67	0.7	0.3	0.6	
	% CV	1.52%	1.88%	1.97%	0.86%	1.70%	
EV70 2X LOD	Total Agreement	5/5	5/5	5/5[4]	5/5	20/20	100%
	Average	37.38	37.3	37.55	36.88	37.2	
	SD	1.78	0.74	2.01	0.81	1.3	
	% CV	4.76%	1.98%	5.35%	2.20%	3.49%	
EV70 4X LOD	Total Agreement	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100%
	Average	36.50	36.60	36.12	35.94	36.29	
	SD	0.58	0.97	0.29	0.84	0.72	
	% CV	1.59%	2.65%	0.80%	2.34%	1.98%	
Number of instruments used		10	11	10	10	31	
Number of modules used		40	41	41	40	121	

[1] Total runs = 21, 2 – No Result, 1 – Invalid

[2] Total runs = 5, 1 negative instead of positive result

[3] Total runs = 5, 1 – Invalid

[4] Total runs = 6, 1– No Result

References

1. Viral ("Aseptic") Meningitis. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases: Respiratory and Enteric Viruses Branch. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm (accessed April 11, 2006).
2. Rotbart HA. Viral meningitis. Semin Neurol. 2000; 20(3): 277-92.
3. Romero JR, Rotbart HA. Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003: 1427-1438.
4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, et al. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 2002; 21: 283-6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Wright HT, McAllister RM, Ward R. "Mixed" Meningitis: Report of a Case with Isolation of Haemophilus Influenzae Type B and ECHO Virus Type 9 from the Cerebrospinal Fluid. New England Journal of Medicine. 1962; 267: 142-144.
8. Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacteria and viral pathogens from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal. 1988; 7: 552-556.
9. Dronkert ML, Ketel AG, de Groot R. Simultaneous occurrence of group B Streptococcus and echovirus 20. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 915.

Assistance

For assistance, contact Cepheid using one of the following contact details. Make sure you provide the instrument serial number and reagent lot ID when you call or email.

North America

For technical support, use the following contact details:

Tel: +1.888.838.3222

Email: techsupport@cepheid.com

You can reach Cepheid Technical Support by telephone Monday through Friday, from 6 A.M. to 5 P.M. Pacific Time.

European Union

For technical support, use the following contact details:

Tel: +33.563.82.53.19

Email: techsupport@cepheideurope.fr

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Symbol	Meaning
REF	Catalog number
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Do not reuse
	Caution, consult accompanying document
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Expiration date
CONTROL	Control
EC REP	Authorized representative in the European Community
+2 +28 °C	Temperature limitation
	Biological hazard

Manufacturer

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Email: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Français

Dispositif médical pour diagnostic *in vitro*

Nom déposé

Xpert® EV

Nom d'usage

Test EV Xpert

Utilisation prévue

Le test EV Xpert de Cepheid® est une transcription inverse - amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) effectuée sur le GeneXpert® Dx System pour la détection qualitative présumée d'ARN d'entérovirus dans des échantillons de liquide céphalorachidien (LCR) de patients présentant des signes ou des symptômes de méningite. Ce test, conjointement avec d'autres résultats de laboratoire et d'autres informations cliniques, peut être utilisé comme une aide pour le diagnostic de laboratoire d'infections à entérovirus chez des patients présentant une suspicion clinique de méningite ou de méningo-encéphalite. Les caractéristiques des performances du test n'ont pas été établies pour les patients immunocompromis ou immunodéprimés.

ATTENTION : Les résultats obtenus avec le test EV Xpert doivent venir uniquement en complément des observations cliniques et des autres informations à la disposition du médecin. Des résultats EV Xpert positifs n'excluent pas d'autres causes de méningite, y compris les bactéries, les mycobactéries, d'autres virus (par exemple les virus de la famille des herpès, les arbovirus, le virus des oreillons, etc.) et les champignons.

Résumé et explication

Le test EV Xpert de Cepheid® est une transcription inverse - amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) utilisée pour détecter l'ARN d'entérovirus dans des échantillons de liquide céphalorachidien (LCR). L'entérovirus entre dans la classification taxonomique des virus composés des poliovirus, des virus Coxsackie, des écho-virus et des entérovirus.[3] Les entérovirus provoquent une vaste gamme d'infections et se propagent le plus souvent par contact direct avec les sécrétions respiratoires d'une personne infectée.[1] Les symptômes communs sont la fièvre, de forts maux de têtes, des torticolis, des douleurs aux yeux causées par les lumières vives, un état de somnolence ou de confusion, des nausées et des vomissements. Chez les nourrissons, les symptômes incluent la fièvre, l'irritabilité, des difficultés à se réveiller ou une perte d'appétit.[1] Alors que la plupart des infections sont asymptomatiques ou se traduisent par de faibles fièvres, elles entraînent souvent l'hospitalisation, en particulier des nourrissons et des enfants. Environ 90 % des cas de méningites virales sont provoqués par des entérovirus ;[2] ceux-ci constituent la cause la plus courante de méningite aux États-Unis, avec un nombre d'hospitalisations estimé de 30 000 à 50 000 chaque année.[3] La méningite à entérovirus disparaît généralement par elle-même au cours d'une période de 7 à 10 jours. Cependant, des causes non virales de méningites, par exemple les méningites bactériennes, peuvent être graves et entraîner une infirmité ou la mort si elles ne sont pas traitées rapidement ; par conséquent, la méningite doit être prise au sérieux.[1]

Un test de détection d'entérovirus, accompagné d'observations et d'autres informations cliniques, peut aider les médecins à identifier les patients atteints de méningite à entérovirus et contribuer à leur traitement.[4]

Principe de la procédure

Le GeneXpert® Dx System automatise et intègre la purification d'échantillons, l'amplification d'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, en utilisant des tests de PCR et de RT-PCR en temps réel. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel préchargé pour effectuer des tests sur des échantillons prélevés et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches Xpert jetables et à usage unique GeneXpert®, cartouches qui contiennent les réactifs PCR et abritent la procédure de PCR. La contamination croisée entre les échantillons est éliminée car les cartouches sont indépendantes. Pour obtenir une description complète du système, consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert® Dx System*.

Le test EV Xpert est conçu pour détecter l'ARN d'entérovirus (région non traduite en 5' du génome de l'entérovirus entre les nucléotides 452 et 596) dans des échantillons de LCR. Le test inclut des réactifs, des amorces et des sondes pour la détection simultanée d'acide nucléique à partir de l'entérovirus cible et du contrôle du traitement de l'échantillon/contrôle interne (SPC/IC). Le test comprend le SPC/IC pour vérifier le traitement approprié du virus cible et il permet de contrôler la présence d'inhibiteurs dans le test RT-PCR pour éviter un résultat négatif erroné. (Notez que dans le logiciel GeneXpert® Dx System, CIC est le nom donné au SPC/IC.) Le test inclut également un contrôle de la sonde pour vérifier la réhydratation du réactif, l'intégrité de la sonde et le remplissage du tube de réaction dans la cartouche.

Pour effectuer un test, l'échantillon de LCR et quatre réactifs sont transférés dans les chambres désignées de la cartouche EV Xpert. GeneXpert® Dx System réalise la préparation des échantillons en lysant le virus et le SPC (pseudovirion d'ARN encapsidé), en liant l'ARN à la matrice extraite et en éluant l'ARN. L'ARN est mélangé à des réactifs RT secs puis est transféré dans le tube de réaction pour la préparation d'ADNc. L'ADNc est alors mélangé à des réactifs PCR secs puis est transféré dans le tube de réaction, en vue d'une PCR en temps réel et d'une détection. Les amorces et les sondes EV amplifient et détectent une région de consensus de la région 5' non traduite de l'entérovirus. Le test dure environ 2,5 heures.

Réactifs et appareils

Matériel fourni

Le kit du test EV Xpert (GXEV-100N-10) contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons. Le kit contient ce qui suit :

Cartouches EV Xpert — **10 cartouches/kit**

Bille de réactifs 1 (lyophilisée) — **1 par cartouche**

- Transcriptase inverse
- Inhibiteur de ribonucléases
- dNTPs
- SAB (sérum albumine bovin)

Bille de réactifs 2 (lyophilisée) — **1 par cartouche**

- Amorces antisens d'oligonucléotides
- SAB (sérum albumine bovin)

Bille de réactifs 3 (lyophilisée) — **1 par cartouche**

- Polymérase ADN
- dNTPs
- SAB (sérum albumine bovin)

Bille de réactifs 4 (lyophilisée) — **1 par cartouche**

- Amorces sens d'oligonucléotides
- Sondes d'oligonucléotides aux étiquettes fluorescentes
- SAB (sérum albumine bovin)

Bille de réactifs 5 (lyophilisée) — **1 par cartouche**

- Contrôle du traitement de l'échantillon (pseudovirion d'ARN CIC encapsidé)
- SAB (sérum albumine bovin)

Réactif de fixation (1) — **10 × 1 ml**

- Éthanol
- Eau

Réactif de lavage (2) — **10 × 3,2 ml**

- Cystéamine HCl
- EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique)
- KCl
- MTG (monothioglycerol)
- PEG (polyéthylèneglycol)
- Tris, pH 7,0
- Tween-20
- Eau

Réactif d'élution (3) — **10 × 2,0 ml**

- Sulfate d'ammonium
- EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique)
- Tris, pH 7,0
- Eau

Réactif de lyse (4) — **10 × 300 µl**

- N-acétyl-L-cystéine
- Guanidine thiocyanate
- N-lauroylsarcosine
- Citrate de sodium, pH 6,8
- Eau

Remarques :

- Les fiches techniques de données de sécurité (Material Safety Data Sheets, MSDS) de tous les réactifs fournis dans ce test sont disponibles auprès de l'Assistance technique de Cepheid.
- Le sérum albumine bovin (SAB) de ce produit a été extrait exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. La fabrication du SAB est également réalisée aux États-Unis. Les aliments donnés aux animaux ne contenaient pas de protéines de ruminants ou d'autres protéines animales ; les animaux ont subi des tests ante et post mortem. Au cours du processus, aucun mélange ne s'est produit avec d'autres matières animales.

Stockage et manipulation

- Stockez les cartouches EV Xpert et les réactifs entre 2 et 28 °C.
- N'ouvrez pas de cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.
- Utilisez la cartouche et les réactifs dans les 30 minutes qui suivent l'ouverture de l'emballage.
- N'utilisez pas les cartouches ou les réactifs dont la date d'expiration est dépassée.
- N'utilisez aucun réactif devenu trouble ou décoloré.

Matériel requis mais non fourni

- GeneXpert® Dx System (la référence varie en fonction de la configuration) : Appareil GeneXpert®, ordinateur, lecteur de code-barres et manuel d'utilisation
- Imprimante (consultez le *Manuel d'utilisation du GeneXpert® Dx System* pour obtenir des indications de compatibilité)
- CD du test EV Xpert (référence 950-0125)
- Pipette de 200 µl
- Embouts de pipette stériles de 200 µl

Avertissements et précautions

- Uniquement pour une utilisation de diagnostic *in vitro*.
- Le réactif de lyse contient de la guanidine thiocyanate qui peut former des composés hautement réactifs lorsqu'elle est combinée avec de l'eau de Javel. Si du liquide contenant ce réactif est renversé, nettoyez la zone avec du détergent de laboratoire et de l'eau.
- Traitez tous les échantillons biologiques, y compris les cartouches, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Tous les échantillons humains doivent être traités avec des précautions identiques car il est souvent impossible de savoir lequel peut être infectieux. Les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies)[5] et le Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards) tiennent à disposition des directives concernant la manipulation des échantillons.[6]
- Éliminez toutes les substances dangereuses ou biologiquement contaminées conformément aux directives de votre institution. Jetez toutes les substances de manière acceptable et sûre, conformément aux exigences fédérales, nationales et locales.

Collecte d'échantillons et transport

Prélevez le LCR dans un récipient stérile et transportez-le dans le laboratoire conformément aux consignes d'utilisation standard de votre institution. Conservez les échantillons entre 2 et 8°C jusqu'à ce que vous les testiez ou congelez-les si le test n'est pas réalisé dans

les 72 heures suivant leur collecte. Ne congelez et ne décongelez pas les échantillons plus de deux fois. Il n'est pas recommandé de centrifuger l'échantillon.

Procédure

Précautions

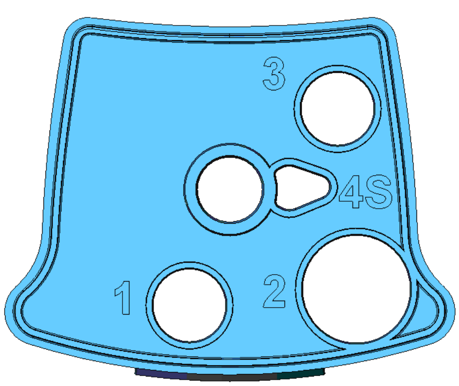
- Ne remplacez pas les réactifs EV Xpert par d'autres réactifs.
- N'ouvrez pas le couvercle de la cartouche EV Xpert, sauf pour ajouter un échantillon et des réactifs.
- Ne chargez pas une cartouche EV Xpert qui est tombée ou qui a été secouée après avoir inséré l'échantillon et les réactifs.
- Ne chargez pas une cartouche dont le tube de réaction est endommagé.
- N'ouvrez pas les cartouches EV Xpert utilisées.
- Ne réutilisez pas les cartouches EV Xpert utilisées.
- Ne congelez et ne décongelez pas les échantillons plus de deux fois.
- N'utilisez pas des échantillons qui ont été centrifugés.

Préparation de la cartouche

Pour ajouter l'échantillon et les réactifs dans la cartouche (Figure 1) :

1. Enlevez la cartouche et les réactifs de l'emballage.
2. Ouvrez l'ampoule (1) de réactif de fixation en tordant et en détachant la pointe.
3. Insérez l'embout de l'ampoule (1) de réactif de fixation dans la chambre de la cartouche 1 et pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit vidé.
4. Ouvrez l'ampoule (2) de réactif de lavage en tordant et en détachant la pointe.
5. Insérez l'embout de l'ampoule (2) de réactif de lavage dans la chambre de la cartouche 2 et pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit vidé.
6. Ouvrez l'ampoule (3) de réactif d'élution en tordant et en détachant la pointe.
7. Insérez l'embout de l'ampoule (3) de réactif d'élution dans la chambre de la cartouche 3 et pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit vidé.
8. À l'aide de la pipette de 200 µl, ajoutez 140 µl de réactif de lyse (4) dans la chambre de la cartouche 4S. Jetez le flacon de réactif de lyse (4).
9. À l'aide de la pipette de 200 µl, ajoutez 140 µl d'échantillon dans la chambre de la cartouche 4S. Afin d'empêcher la formation de grosses bulles d'air, assurez-vous de maintenir l'embout de la pipette sur le haut de la chambre et versez doucement l'échantillon.
10. Fermez le couvercle de la cartouche.

Important : Assurez-vous de charger la cartouche dans l'appareil GeneXpert® Dx et de commencer le test dans les 30 minutes qui suivent l'ajout des réactifs.



1 = Réactif de fixation

2 = Réactif de lavage

3 = Réactif d'élution

4S = Réactif de lyse et échantillon

Figure 1. Cartouche EV Xpert (vue de dessus).

Démarrage du test

Important : Avant de démarrer le test EV Xpert, assurez-vous que sa définition est importée dans le logiciel (consultez les instructions fournies avec le CD de test). Si vous ne disposez pas du CD de test EV Xpert, contactez le support technique de Cepheid.

Cette section répertorie les étapes de base de la réalisation du test. Pour obtenir des instructions détaillées, consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert® Dx System.*

1. Allumez l'ordinateur, puis mettez l'appareil GeneXpert® Dx sous tension.
2. Sur le bureau Windows®, double-cliquez sur l'icône de raccourci GeneXpert® Dx.
3. Ouvrez une session du logiciel GeneXpert® Dx System en utilisant votre nom d'utilisateur et votre mot de passe.
4. Dans la fenêtre du GeneXpert® Dx System, cliquez sur **Créer le test.** La boîte de dialogue Lire le code-barres de la cartouche s'affiche.
5. Scannez le code-barres sur la cartouche EV Xpert. La fenêtre **Créer le test** apparaît. En utilisant les informations du code-barres, le logiciel remplit automatiquement les cases suivantes : **Select Assay (Sélectionner le test)**, **Reagent Lot ID (Numéro d'identification du lot de réactifs)**, **Cartridge SN (NS de la cartouche)** et **Expiration Date (Date limite d'utilisation)**.
6. Dans la case **N° Id de l'échantillon**, scannez ou saisissez le N° Id de l'échantillon. Assurez-vous de saisir le N° Id exact de l'échantillon. Il est associé aux résultats du test et il est affiché dans la fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** et dans tous les rapports.
7. Cliquez sur **Démarrer le test.** Dans la boîte de dialogue qui apparaît, saisissez votre mot de passe.
8. Ouvrez la porte du module de l'appareil où le voyant vert clignote et chargez la cartouche.
9. Fermez la porte du module. Assurez-vous que le voyant est bien vert.
10. Lorsque le test est terminé, le voyant du module de l'appareil s'éteint.
11. Attendez que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et de retirer la cartouche.
12. Respectez les directives de sécurité de votre laboratoire pour éliminer la cartouche.

Affichage et impression des résultats

Pour obtenir des instructions détaillées sur la manière d'afficher et d'imprimer les résultats, consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert® Dx System.*

CONTROL Contrôle qualité

Les contrôles qualité doivent être effectués conformément aux exigences des réglementations et des accréditations locales, nationales et/ou fédérales et aux procédures de contrôle qualité standard de votre laboratoire.

Chaque test inclut deux contrôles internes pour le valider : Contrôles du traitement/contrôle interne de l'échantillon et de la sonde. Les échantillons de test sont contrôlés conformément aux procédures suivantes :

- **Contrôle du traitement de l'échantillon/contrôle interne (SPC/IC) :** le SPC/IC est un pseudovirion d'ARN encapsidé sous forme de billes de réactifs ; il est inclus dans chaque cartouche. Le SPC/IC vérifie la lyse adéquate de l'EV cible et du traitement de l'échantillon et détecte les interférences du test.

  Les billes de réactifs sont mélangées à l'échantillon pour contrôler le traitement de l'échantillon approprié et pour surveiller l'intégrité du test RT-PCR. Le SPC/IC est considéré comme réussi s'il répond aux critères d'acceptation validés. Notez que dans le logiciel GeneXpert® Dx System, CIC est le nom donné au SPC/IC.

- **Contrôle de la sonde :** avant le début de la réaction PCR, le système procède à un contrôle de la sonde à la fois sur l'EV cible et sur le SPC/IC pour vérifier la réhydratation des billes de réactifs et le remplissage du tube de réaction. Chaque contrôle de la sonde est considéré comme réussi s'il répond aux critères d'acceptation validés.
- **Contrôles externes :** ils doivent être utilisés pour la formation, l'essai d'aptitude et le contrôle qualité externe de GeneXpert Dx System. Les contrôles externes doivent être utilisés en accord avec les organisations d'accréditation locales, nationales, fédérales, comme approprié. Les contrôles externes peuvent être préparés en diluant une souche A9 de virus Coxsackie : souche de Bozek ou A6 de virus Coxsackie C.G. (Gdula) avec du LCR de patient négatif connu ou du LCR synthétique (par exemple, référence HSP-515 de SeraCare Life Sciences Inc.) d'environ 10 à 1 000 $DICT_{50}$/mL donnant une plage du C_t d'entérovirus de 32 à 35 pour le test EV Xpert.

Interprétation des résultats

Les résultats sont disponibles dans la fenêtre View Results (Afficher les résultats) de GeneXpert® Dx System. Les résultats possibles sont décrits dans cette section.

Remarque : Dans la fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** de GeneXpert® Dx System, le SPC/IC est affiché en tant que CIC dans la colonne **Analyte Name (Nom de l'analyte)**.

ATTENTION : Les résultats obtenus avec le test EV Xpert doivent venir uniquement en complément des observations cliniques et des autres informations à la disposition du médecin. Des résultats EV Xpert positifs n'excluent pas d'autres causes de méningite, y compris les bactéries, les mycobactéries, d'autres virus (par exemple les virus de la famille des herpès, les arbovirus, le virus des oreillons, etc.) et les champignons.

POSITIF (Figure 2)

L'acide nucléide cible de l'entérovirus est détecté (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que le SPC/IC est affiché en tant que CIC) :

- EV : POS
- CIC (SPC/IC) : NA (lorsque la concentration de l'entérovirus est élevée, la RT-PCR pour le SPC doit être supprimée.)
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde : RÉUSSITE)
- **Des résultats EV Xpert positifs n'excluent pas d'autres causes de méningite, y compris les bactéries, les mycobactéries, d'autres virus (par exemple les virus de la famille des herpès, les arbovirus, le virus des oreillons, etc.) et les champignons.**

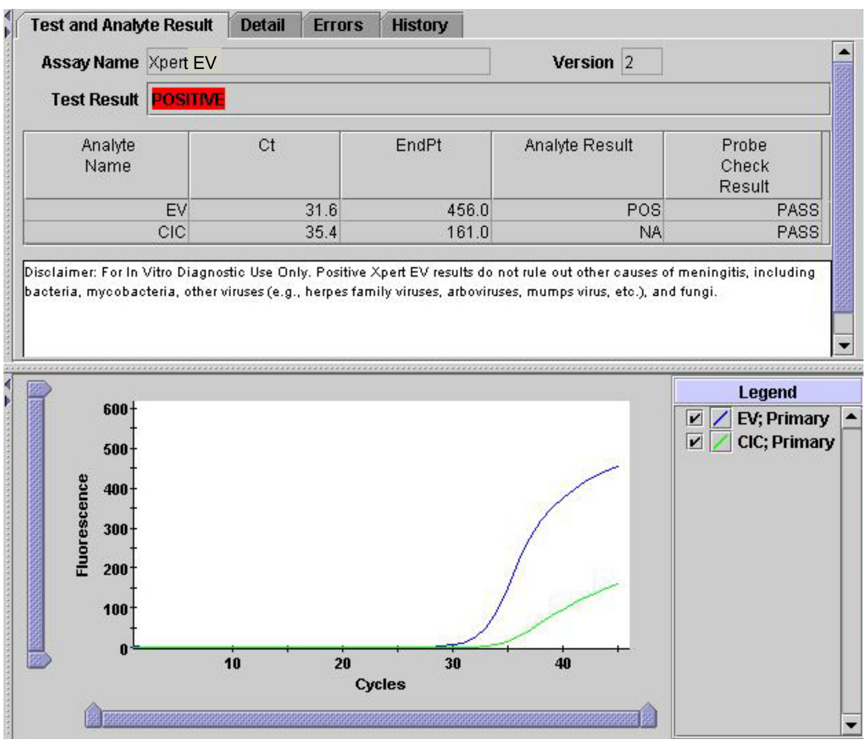


Figure 2. Résultat positif (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que le SPC/IC est affiché en tant que CIC.)

NÉGATIF (Figure 3)

L'acide nucléide cible d'entérovirus n'est pas détecté, mais le SPC satisfait aux critères d'acceptation (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que

le SPC/IC est affiché en tant que CIC) :

- EV : NEG
- CIC (SPC/IC) : PASS
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde : RÉUSSITE)
- **Des résultats EV Xpert négatifs n'excluent pas que les entérovirus sont une cause de méningite mais qu'ils n'ont pas été détectés.**

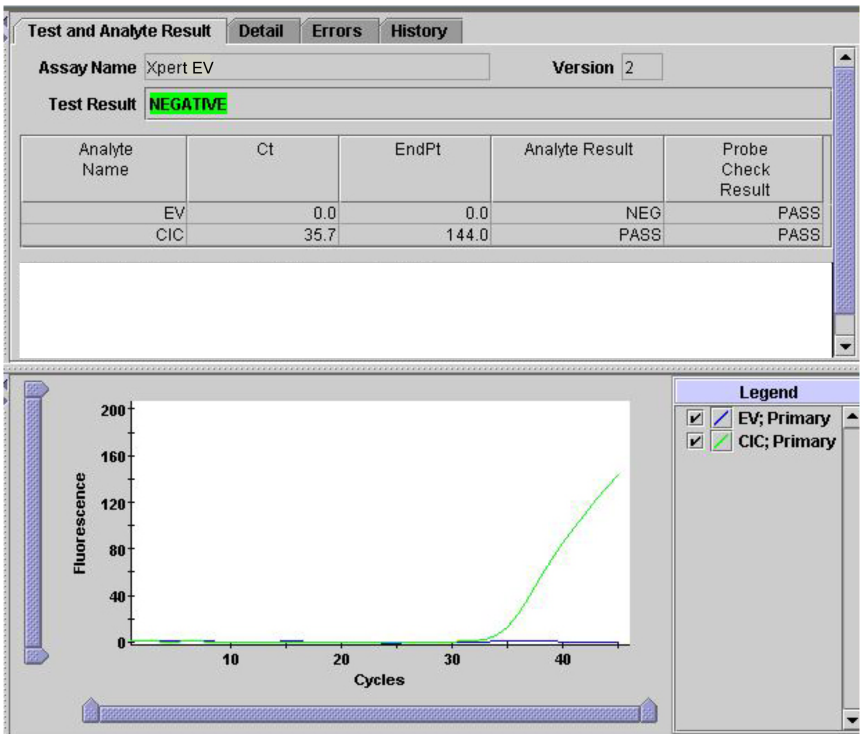


Figure 3. Résultat négatif (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que le SPC/IC est affiché en tant que CIC.)

NON VALIDE (Figure 4)

S'il est impossible de déterminer la présence ou l'absence d'acide nucléide cible d'entérovirus, répétez le test avec un échantillon supplémentaire. Le SPC/IC ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR est inhibée (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que le SPC/IC est affiché en tant que CIC) :

- EV : INVALID
- CIC (SPC/IC) : FAIL
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde : RÉUSSITE)

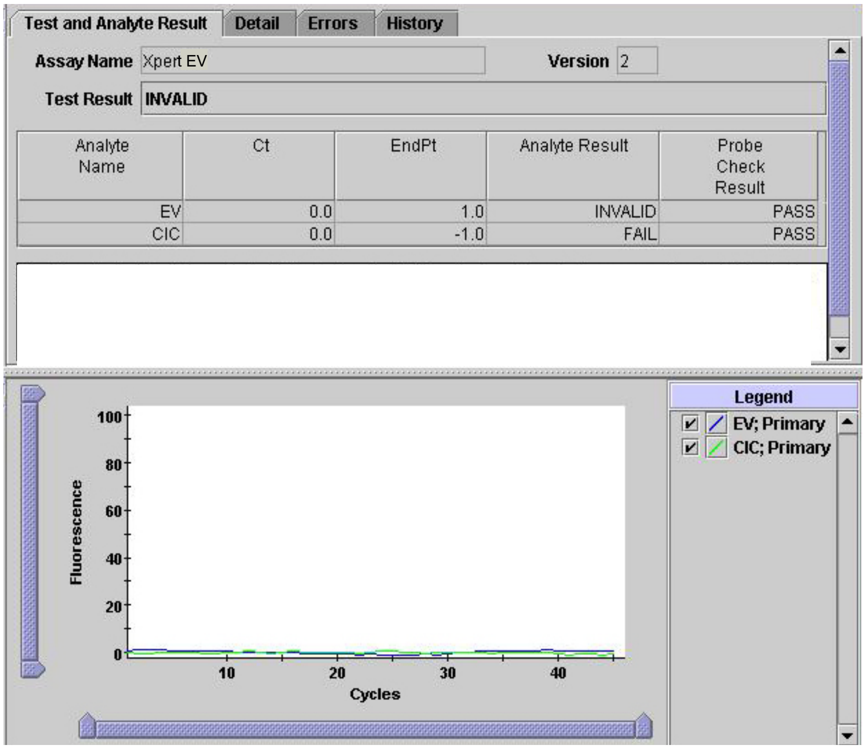


Figure 4. Résultat non valide (fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** du GeneXpert® Dx System. Notez que le SPC/IC est affiché en tant que CIC.)

ERREUR

S'il est impossible de déterminer la présence ou l'absence d'acide nucléide cible d'entérovirus, répétez le test avec un échantillon supplémentaire. L'échec du contrôle de la sonde est probablement dû au remplissage incorrect du tube de réaction, un problème d'intégrité de la sonde a été détecté ou le test a été interrompu :

- EV : NO RESULT
- CIC (SPC/IC) : NO RESULT
- Probe Check : FAIL

PAS DE RÉSULTAT

S'il est impossible de déterminer la présence ou l'absence d'acide nucléide cible d'entérovirus, répétez le test avec un échantillon supplémentaire. Trop peu de données ont été collectées pour produire un résultat de test (par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours) :

- EV : NO RESULT
- CIC (SPC/IC) : NO RESULT
- Contrôle de la sonde : NA

Raisons pour lesquelles le test doit être recommencé

Répétez le test avec un nouvel échantillon si les résultats suivants sont produits :

- Le résultat NON VALIDE indique que les SPC/IC ont échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR est inhibée.
- Le résultat ERREUR indique l'échec du contrôle de la sonde et l'interruption du test, probablement à cause du remplissage incorrect du tube de réaction, car un problème d'intégrité de la sonde de réactif a été détecté ou car les limites maximales de pression ont été dépassées.
- Le résultat PAS DE RÉSULTAT indique que trop peu de données ont été collectées. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours.

Restrictions

- Les résultats du test EV Xpert doivent être interprétés conjointement avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien. Un résultat positif du test EV Xpert n'exclut pas la présence d'un autre agent pathogène comme des bactéries dans le LCR. Comme pour tous les tests moléculaires, des résultats positifs erronés sont toujours possibles. De rares occurrences de méningites à la fois bactériennes et virales ont été signalées dans les publications.[7, 8, 9]
- Les performances du test EV Xpert ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice et dans le GeneXpert® Dx System de Cepheid. Aucune modification ne doit être apportée à ces procédures car cela peut modifier les performances du test.
- Le test EV Xpert est destiné à la détection d'entérovirus uniquement. Des résultats de test négatifs n'excluent pas la présence d'entérovirus. Ce test n'exclut pas l'éventualité d'une méningite associée à un herpès ou d'une méningite fongique ; des tests supplémentaires sont requis pour exclure ces infections.

ATTENTION : Comme avec d'autres procédures de diagnostic, les résultats obtenus avec le test EV Xpert doivent venir uniquement en complément des observations cliniques et des autres informations à la disposition du médecin. Des résultats EV Xpert positifs n'excluent pas d'autres causes de méningite, y compris les bactéries, les mycobactéries, d'autres virus (par exemple les virus de la famille des herpès, les arbovirus, le virus des oreillons, etc.) et les champignons.

Substances interférentes

Des études ont été réalisées avec des substances interférentes potentielles rencontrées dans le LCR. Ces substances ont été testées avec des globules blancs, des protéines, du sang total et de l'hémoglobine. Le contenu des leucocytes a été testé grâce à des leucocytes (cellules leucémiques humaines K562) étudiés en solution dans du LCR.

Pour traiter les interférences potentielles provenant de ponctions sanglantes, des échantillons de LCR humain contaminés avec plusieurs niveaux de sang ont été testés (jusqu'à 125 000 hématies/mm^3).

Les gammes de concentration et les substances interférentes trouvées dans du LCR normal sont indiquées dans le Tableau 1a. Les gammes éventuelles trouvées dans le LCR en cas de méningite sont également indiquées. Chaque substance a été étudiée en solution à des niveaux pouvant être rencontrés chez des patients sains ou atteints de méningite.

Tous les tests ont été réalisés avec du LCR étudié en solution avec le sérotype d'entérovirus CVA9 à 80 $DICT_{50}$/ml (~3x LDD).

Tableau 1a. Échantillons de substances endogènes potentiellement interférentes testés dans le Xpert EV.

Substance	Gamme de concentration trouvée dans du LCR normal	Gamme de concentration LCR potentielle (en cas de méningite)	Échantillon testé avec le Xpert EV	Concentrations testées
Leucocytes	0 à 5 cellules/mm^3	5 à 5 000 cellules/mm^3	Cellules K562	Cellules/mm^3 : 0, 3.57, 35.7, 357, 7140
Protéines du LCR	13 à 40 mg/dl	15 à 217 mg/dl	SAB : IgG (rapport 1:1)	Concentration de protéines mg/dl 0, 30, 300, 1,071
Sang	Aucune	Sans objet	14 ponctions sanglantes de liquide céphalorachidien humain	0 % à environ 2,5 % v/v de sang
Hémoglobine	12 à 18 g/dl d'hématies	Sans objet sauf dans les ponctions sanglantes	Hémoglobine (poudre ferreuse) étudiée en solution dans le LCR	Hémoglobine g/dl 0, 0.36, 0.71, 2.14, 3.6 [Représente à peu près v/v de sang dans le LCR, respectivement : 0 %, 2.5 %, 5 %, 15 %, 25 %]

Comme indiqué dans le Tableau 1b, des résultats d'entérovirus positifs ont été obtenus même lorsqu'un niveau maximal de substances potentiellement interférentes a été introduit lors du test.

Tableau 1b. Résultats d'étude avec des substances endogènes potentiellement interférentes testées dans le Xpert EV.

Substance interférente	Concentration	C_t d'entérovirus
Aucune (Contrôle n = 8)	Sans objet	36,1
Protéine (n = 4)	1 071 mg/dl	38,2
Leucocytes (n = 4)	7 140 cellules/mm^3	37,2
Ponction sanglante, échantillon 1	2,5 % v/v de sang	35,9
Ponction sanglante, échantillon 2	2,5 % v/v de sang	35,0
Ponction sanglante, échantillon 3	2,5 % v/v de sang	35,3
Hémoglobine (n = 4)	3,6 g/dl	36,9

Caractéristiques des performances

Performances cliniques

Les caractéristiques des performances du test EV Xpert ont été déterminées lors d'une étude multisite réalisée dans six institutions.

Pour être retenu dans le test, un patient doit avoir subi une ponction lombaire réalisée suite à des symptômes de méningite, et un test d'entérovirus et/ou un test viral de culture prescrit par le médecin. Le patient doit disposer d'un volume de LCR en excès suffisant (supérieur ou égal à 0,5 ml) et avoir remis un formulaire de consentement éclairé écrit si nécessaire. Des échantillons de patients ont été exclus si le LCR destiné au test d'acide nucléique avait été centrifugé ou si le test EV Xpert et des tests de détermination de vérité clinique n'avaient pas été réalisés au cours du même cycle de gel-dégel de l'échantillon. L'histoire clinique des patients a également été prise en compte : signes et symptômes cliniques ; nombre de jours depuis l'apparition des symptômes ; température maximale ; histoire du sujet-contact ; hématies dans le LCR, leucocytes et différentiel ; glucose et protéines totales dans le LCR ; culture bactérienne et coloration Gram du LCR ; glycémie ; culture virale à partir d'autres échantillons, si disponibles.

Un patient a été déclaré porteur d'une méningite à entérovirus (diagnostic clinique) si les critères suivants étaient rencontrés : preuve clinique de méningite, résultats de laboratoire pour la coloration Gram du LCR, la culture bactérienne du LCR, le glucose du LCR, le rapport glucose du LCR-glycémie, la concentration totale des protéines du LCR, la numération des leucocytes du LCR et la détection du génome d'un entérovirus dans le LCR et/ou la culture positive d'entérovirus dans le LCR.

À l'origine, 475 patients se sont présentés. Quarante et un patients ne répondaient pas aux critères d'inclusion dans l'étude et ont donc été éliminés de l'analyse ; sur les 434 sujets analysables, 255 ont produit des résultats pour tous les tests décrits ci-dessus.

Tableau 2a. Échantillons cliniques prospectifs évalués par rapport au « diagnostic clinique »

Au total, 199 futurs patients admissibles ont été retenus, 133 patients ont produit les 6 résultats de laboratoire pour l'évaluation de la « vérité clinique ». La sensibilité et la spécificité cliniques du test EV Xpert sont présentées dans le tableau ci-dessous.

		Diagnostic clinique[1]	
		+	-
Xpert EV	+	26	3
	-	1	103
Total		**27**	**106**

Sensibilité clinique : 96,3 % (26/27) ; 95 % CI 81,0 à 99,9 %

Spécificité clinique : 97,2 % (103/106) ; 95 % CI 91,9 à 99,4 %

Tableau 2b. Échantillons cliniques collectés de manière prospective, conservés et évalués par rapport au « diagnostic clinique »

Au total, 235 anciens patients admissibles ont été retenus, 122 patients ont produit les 6 résultats de laboratoire pour l'évaluation de la « vérité clinique ». La sensibilité et la spécificité cliniques du test EV Xpert sont présentées dans le tableau ci-dessous.

		Diagnostic clinique[1]	
		+	-
Xpert EV	+	23	3
	-	0	96
Total		23	99

[1] Un patient est déclaré porteur d'une méningite à entérovirus (diagnostic clinique) si les critères suivants sont rencontrés : preuve clinique de méningite, résultats de laboratoire pour la coloration Gram du LCR, la culture bactérienne du LCR, le glucose du LCR, le rapport glucose du LCR-glycémie, la concentration totale des protéines du LCR, la numération des leucocytes du LCR et détection du génome d'un entérovirus dans le LCR ou culture d'entérovirus positive dans le LCR.

Sensibilité clinique : 100 % (23/23) ; 95 % CI 85,2 à 100 %
Spécificité clinique : 97,0 % (96/99) ; 95 % CI 91,4 à 99,4 %

Tableau 2c. Performance cliniques du test EV Xpert en ce qui concerne le « diagnostic clinique » par âge.

Les 133 échantillons cliniques prospectifs et les 122 échantillons cliniques collectés de manière prospective et conservés étaient regroupés par âge. La sensibilité et la spécificité cliniques de chaque groupe d'âge sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

	Échantillons cliniques prospectifs		**Échantillons cliniques collectés de manière prospective et conservés**	
Âge	**Sensibilité clinique**	**Spécificité clinique**	**Sensibilité clinique**	**Spécificité clinique**
Néonatal (moins de 2 mois)	100,0 % (14/14)	96,0 % (24/25)	100,0 % (4/4)	90,0 % (18/20)
Pédiatrie (de 2 mois à 17 ans)	92,3 % (12/13)	97,2 % (69/71)	100,0 (14/14)	98,1 % (51/52)
Adultes (18 ans et plus)	(0/0)	100,0 % (10/10)	100,0 % (5/5)	100,0 % (27/27)
Total	96,3 % (26/27)	97,2 % (103/106)	100,0 % (23/23)	97,0 % (96/99)

Des cultures virales ont été réalisées sur 73,7 % (320/434) des échantillons admissibles ; les échantillons restants disposaient de trop peu de LCR pour la culture. Les échantillons de 263 sujets dont le volume de LCR était en excès suffisant ont été envoyés à un laboratoire central désigné pour la culture virale. En outre, des cultures virales de 114 échantillons de patient ont été réalisées sur les sites de sélection. Sur ces 114 sujets, 57 ont permis de réaliser des cultures virales sur les sites de sélection et dans le laboratoire central. Sur 57 sujets, 56 présentaient des résultats de culture concordants et un sujet présentait des résultats de culture locale et centrale divergents.

Le laboratoire central utilisait des flacons à échantillons cylindriques Super E-Mix pour la culture virale et les cellules étaient colorées par des anticorps d'entérovirus. Les cellules qui étaient positives à l'anticorps des entérovirus se coloraient davantage avec un anticorps d'immuno-fluorescence indirecte pour l'identification d'entérovirus. Chaque site de sélection utilisait sa propre procédure standard pour la culture virale.

Tableau 3a. Échantillons cliniques prospectifs évalués par rapport à la culture virale

Sur les 199 échantillons prospectifs admissibles, 131 ont produit des résultats de culture virale. Aucun résultat divergent relatif au test de culture virale des sites de sélection et du laboratoire central n'a été produit. Les accords positifs et négatifs entre le test EV Xpert et la culture virale sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

		Culture virale	
		+	-
Xpert EV	+	8	13
	-	0	110
Total		8	123

Accord positif : 100,0 % (8/8) 95 % CI 63,1 à 100,0 %
Accord négatif : 89,4 % (110/123) CI 82,65 à 94,3 %

Tableau 3b. Échantillons cliniques collectés de manière prospective, conservés et évalués par rapport à la culture virale

Sur les 235 échantillons rétrospectifs admissibles, 211 ont produit des résultats de culture virale. Les accords positifs et négatifs entre le test EV Xpert et la culture virale sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

		Culture virale	
		+	-
Xpert EV	+	22	35
	-	1	153
Total		23	188

Accord positif : 95,7 % (22/23) ; 95 % CI 78,1 à 99,9 %
Accord négatif : 81,4 % (153/188) ; 95 % CI 75,1 à 86,7 %

Tableau 4. Valeurs attendues du test EV Xpert pour une population présentant des signes et des symptômes de méningite

Les 434 patients admissibles sont regroupés par âge et par sexe ; le nombre et le pourcentage de cas positifs sont calculés et indiqués dans le tableau ci-dessous.

		Résultat du Xpert EV		
Tranche d'âge (années)	**Sexe**	**Nombre de cas positifs (%)**	**Nombre de cas négatifs (%)**	**Total**
< 1	M	34 (29,3)	82 (70,7)	116
	F	26 (28,3)	66 (71,7)	92
1 à 5	M	8 (25,0)	24 (75,0)	32
	F	3 (11,1)	24 (88,9)	27
6 à 10	M	3 (31,4)	24 (68,6)	35
	F	3 (17,6)	14 (82,4)	17
11 à 15	M	8 (33,3)	16 (66,7)	24
	F	3 (15,0)	17 (85,0)	20
16 à 21	M	3 (20,0)	12 (80,0)	15
	F	3 (25,0)	9 (75,0)	12
>21	M	2 (10,0)	18 (90,0)	20
	F	3 (12,5)	21 (87,5)	24
Total		107 (24,7)	327 (75,3)	434

Test de réactivité analytique/sérotype d'entérovirus

Au total, 60 sérotypes d'entérovirus ont été testés avec le test EV Xpert. Chaque sérotype constituant le stock viral a été dilué en trois réplicats à la LDD présumée. Les dilutions ont été réalisées dans un mélange d'échantillons humains négatifs aux entérovirus. La sensibilité analytique estimée est indiquée dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Sensibilité analytique estimée.

Soixante sérotypes ont été testés et les $DICT_{50}$/ml estimés détectés dans ces sérotypes sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Espèces	Sérotype	$DICT_{50}$/ml estimé
A	Coxsackie A3	5,01
A	Coxsackie A5	12,59
A	Coxsackie A6	12,59
A	Coxsackie A7	3,33
A	Coxsackie A10	2,81
A	Coxsackie A12	19,95
A	Coxsackie A14	0,10
A	Coxsackie A16	0,002
A	EV 71	0,16
B	Coxsackie A9	20,00
B	Coxsackie B1	4,00
B	Coxsackie B2	0,20
B	Coxsackie B3	0,028
B	Coxsackie B4	0,40
B	Coxsackie B5	0,04
B	Coxsackie B6	0,01
B	Écho 1	0,10
B	Écho 2	0,032
B	Écho 3	200,00
B	Écho 4	0,00032
B	Écho 5	0,032
B	Écho 6	200,00
B	Écho 7	2,00
B	Écho 8	0,10
B	Écho 9	2,00
B	Écho 11	40,00
B	Écho 12	1,58
B	Écho 13	0,01
B	Écho 14	0,0005
B	Écho 15	0,0032
B	Écho 16	0,0005
B	Écho 17	0,05
B	Écho 18	0,0002
B	Écho 19	2,51
B	Écho 20	0,032
B	Écho 21	1,00
B	Écho 24	0,02
B	Écho 25	0,50
B	Écho 26	0,032
B	Écho 27	0,00032
B	Écho 29	5,01
B	Écho 30	0,01
B	Écho 31	0,0032
B	Écho 32	0,10
B	Écho 33	0,05
B	EV 69	0,0002
C	Coxsackie A11	0,11
C	Coxsackie A13	13,27
C	Coxsackie A15	0,0032
C	Coxsackie A17	1,58
C	Coxsackie A18	0,02
C	Coxsackie A19	0,03
C	Coxsackie A20	0,002
C	Coxsackie A21	0,03
C	Coxsackie A22	0,02
C	Coxsackie A24	0,10
D	EV 68	199,53
D	EV 70	2,00
Poliovirus	Poliovirus 1	2,00
Poliovirus	Poliovirus 2	0,40
Poliovirus	Poliovirus 3	20,00

Spécificité analytique

Les séquences de l'amorce et de la sonde utilisées dans le test EV Xpert ne détectent pas l'acide nucléique extrait des organismes suivants connus pour provoquer des symptômes proches de ceux de la méningite : VEB, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, AdV-2, rougeole, oreillons, Parainfluenza 1-3, grippe A, grippe B, VZV, CMV, streptocoques du groupe B, *Haemophilus influenzae* B, *H. influenzae* non-B, *Escherichia coli, Neisseria meningitidis, Citrobacter freundii* et *Citrobacter koseri ;* le test EV Xpert ne génère pas d'amplicon détectable lorsque « tous les organismes » des agents pathogènes répertoriés sont traités par le biais de la cartouche EV Xpert. Le tableau ci-dessous présente les organismes testés et leur concentration.

Tableau 6. Spécificité analytique du test EV Xpert.

La spécificité de tous les organismes a été testée dans le test EV Xpert et les concentrations des organismes testés sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Organisme	Concentration/test
HHV-6	3,1 x 10^6 particules
HHV-7	1,4 x 10^7 particules
CMV	700 $DICT_{50}$
VEB	140 $DICT_{50}$
HSV-1	1,4 x 10^5 $DICT_{50}$
HSV-2	1,4 x 10^5 $DICT_{50}$
AdV-2	1,4 x 10^{12} $DICT_{50}$
Rougeole	700 $DICT_{50}$
Oreillons	1,4 x 10^4 $DICT_{50}$
Parainfluenza 1	1,4 x 10^3 $DICT_{50}$
Parainfluenza 2	7 x 10^3 $DICT_{50}$
Parainfluenza 3	1,4 x 10^4 $DICT_{50}$
Grippe A	3,5 x 10^4 $DICT_{50}$
Grippe B	3,5 x 10^4 $DICT_{50}$
VZV	14 $DICT_{50}$
Streptocoques du groupe Bs	7 x 10^6 cellules
H. influenzae B	7 x 10^6 cellules
H. influenzae non-B	7 x 10^5 cellules
E.coli	7 x 10^6 cellules
N. meningitidis	7 x 10^6 cellules
C. freundii	7 x 10^6 cellules
C. koseri	7 x 10^6 cellules

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique, ou limite de détection (LDD), est définie pour la concentration la plus basse, ou quantité d'analyte pouvant être détectée à plusieurs reprises dans un échantillon négatif avec un niveau de confiance de 95 % selon l'analyse de laboratoire. Les dilutions ont été réalisées dans un mélange d'échantillons humains négatifs aux entérovirus. Pour la détermination de la confiance statistique de la LDD, 20 réplicats et 20 échantillons négatifs d'entérovirus ont été réalisés. Des échantillons ont été réalisés pour : le virus Coxsackie A6 (CVA6), le virus Coxsackie A9 (CVA9), le virus Coxsackie A17 (CVA17), l'entérovirus 70 (EV70) et le poliovirus 1 (PV1). Les 63 sérotypes n'ont pas tous été testés en un nombre de fois statistiquement significatif, car les sites de fixation de l'amorce et de la sonde sont conservés dans tous les sérotypes et la longueur des amplicons est identique pour tous les sérotypes ; ainsi, l'efficacité de l'amplification est censée être la même pour tous les sérotypes. Les cinq sérotypes indiqués ci-dessus ont été sélectionnés pour représenter chacune des espèces d'entérovirus CVA6 (A), CVA9 (B), CVA17 (C), EV70 (D) et PV1 (poliovirus).

Tableau 7. Limite de détection des cinq (5) sérotypes.

LDD des cinq (5) sérotypes, une pour chacune des espèces d'entérovirus indiquées dans le tableau ci-dessous.

Sérotype	Limite de détection ($DICT_{50}$/ml)
CVA9	80,0
EV70	1,3
PV1	4,0
CVA17	1,0
CVA6	33,0

Reproductibilité

La reproductibilité a été contrôlée lors d'une étude multicentrique et en aveugle, à l'aide d'un panel de précision composé de quatre échantillons. Trois sites ont testé chaque panel trois fois par jour pendant 10 jours, pour un total de 90 résultats par échantillon de panel. Le panel de précision était composé d'un échantillon négatif et de trois échantillons positifs, chacun présentant un sérotype d'entérovirus spécifique étudié en solution dans du LCR synthétique à une concentration proche de la limite de détection.

Tableau 8. Résumé des résultats de reproductibilité.

Le pourcentage d'accord, les valeurs de Ct moyennes pour chaque concentration, les déviations standard associées, le pourcentage de variation entre les jours et entre les sites de l'étude de reproductibilité multicentrique sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Nombre d'échantillons classifiés correctement					Entre les jours		Entre les sites		Total	
Sérotype ($DICT_{50}$/ml)	Site 1	Site 2	Site 3	Ct d'entérovirus moyen	Déviations standard	% CV	Déviations standard	% CV	Déviations standard	% CV
Négatif	30/30	30/30	30/30							
CVA6 (134)	30/30	30/30	29/29[1]	35,0	0,343	0,98 %	0,175	0,50 %	1,101	3,15 %
CVA9 (320)	30/30	30/30	30/30	34,4	0	0,00 %	0	0,00 %	0,61	1,77 %
CVA17 (3)	30/30	30/30	29/29[1]	33,8	0	0,00 %	0	0,00 %	0,414	1,22 %
Accord total	120/120	120/120	118/118							
% Accord	100,00%	100,00 %	100,00 %							

[1] Deux échantillons n'ont produit aucun résultat GeneXpert®.

Pour éprouver davantage le système, une seconde étude a été réalisée. Une étude de reproductibilité interne a été menée pendant quatre jours distincts sur plusieurs appareils GeneXpert® (31) et modules ICORE (121). Deux sous-types représentatifs de tous les virus (par exemple, le virus Coxsackie CVA9 et l'entérovirus EV70) ont été étudiés en solution dans du LCR humain négatif pour créer des échantillons simulés à 2 x LDD et 4 x LDD. L'échantillon négatif a été testé 20 fois alors que deux échantillons positifs ont été testés aux deux concentrations cinq (5) fois par jour. Sur tous les échantillons testés, les définitions de contrôle du logiciel de l'appareil ont fourni deux échantillons « Non valide » et trois échantillons « Pas de résultat ». Sur les 157 résultats significatifs, 155 ont été classifiés correctement.

Tableau 9. Résumé des résultats de la deuxième étude de reproductibilité.

Le niveau d'accord, les valeurs de Ct moyennes pour chaque concentration, les déviations standard associées et le pourcentage de variation pour chaque jour sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Identifiant de l'échantillon		Accord total : Résultats C_t					% Accord total
		Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Tous les jours	
Négatif	Accord total	20/20	18/18[1]	20/20	20/20	78/78	100 %
	Moyenne	SO	SO	SO	SO	SO	
	Déviations standard	SO	SO	SO	SO	SO	
	% CV	SO	SO	SO	SO	SO	
CA9 2X LDD	Accord total	4/5[2]	5/5	4/5[2]	5/5	18/20	90 %
	Moyenne	36,65	36,54	36,53	36,54	36,56	
	Déviations standard	0,56	0,46	0,21	0,69	0,48	
	% CV	1,53 %	1,26 %	0,57 %	1,89 %	1,31 %	
CA9 4X LDD	Accord total	5/5	5/5	5/5	4/4[3]	19/19	100 %
	Moyenne	34,98	35,56	35,52	35,03	35,28	
	Déviations standard	0,53	0,67	0,7	0,3	0,6	
	% CV	1,52 %	1,88 %	1,97 %	0,86 %	1,70 %	
EV70 2X LDD	Accord total	5/5	5/5	5/5[4]	5/5	20/20	100 %
	Moyenne	37,38	37,3	37,55	36,88	37,2	
	Déviations standard	1,78	0,74	2,01	0,81	1,3	
	% CV	4,76 %	1,98 %	5,35 %	2,20 %	3,49 %	
EV70 4X LDD	Accord total	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100 %
	Moyenne	36,50	36,60	36,12	35,94	36,29	
	Déviations standard	0,58	0,97	0,29	0,84	0,72	
	% CV	1,59 %	2,65 %	0,80 %	2,34 %	1,98 %	
Nombre d'appareils utilisés		10	11	10	10	31	
Nombre de modules utilisés		40	41	41	40	121	

[1] Nombre total d'expériences = 21, 2 – Pas de résultat, 1 – Non valide
[2] Nombre total d'expériences = 5, 1 résultat négatif à la place d'un résultat positif
[3] Nombre total d'expériences = 5, 1 – Non valide
[4] Nombre total d'expériences = 6, 1 – Pas de résultat

Références

1. Viral ("Aseptic") Meningitis. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases: Respiratory and Enteric Viruses Branch. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm (accessed April 11, 2006).
2. Rotbart HA. Viral meningitis. Semin Neurol. 2000; 20(3): 277-92.
3. Romero JR, Rotbart HA. Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003: 1427-1438.
4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, et al. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 2002; 21: 283-6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Wright HT, McAllister RM, Ward R. "Mixed" Meningitis: Report of a Case with Isolation of Haemophilus Influenzae Type B and ECHO Virus Type 9 from the Cerebrospinal Fluid. New England Journal of Medicine. 1962; 267: 142-144.
8. Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacteria and viral pathogens from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal. 1988; 7: 552-556.
9. Dronkert ML, Ketel AG, de Groot R. Simultaneous occurrence of group B Streptococcus and echovirus 20. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 915.

Assistance

Pour bénéficier d'une assistance, contactez Cepheid en utilisant l'une des informations relatives aux contacts suivants. Assurez-vous de communiquer le numéro de série de l'appareil et le numéro d'identification du lot de réactifs lorsque vous appelez ou envoyez un courrier électronique.

Amérique du Nord

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivants :

Tél. : +1.888.838.3222

Courrier électronique : techsupport@cepheid.com

Vous pouvez joindre l'assistance technique de Cepheid par téléphone du lundi au vendredi, de 6h00 à 17h00, heure du Pacifique.

Union européenne

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivants :

Tél. : +33.563.82.53.19

Courrier électronique : techsupport@cepheideurope.fr

Autres sites

Contactez votre représentant local Cepheid.

Tableau des symboles

Symbole	Signification
REF	Référence
IVD	Appareil à usage médical de diagnostic in vitro
	À ne pas réutiliser
	Attention, consultez le document d'accompagnement
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
	Date limite d'utilisation
CONTROL	Contrôle
EC REP	Mandataire de la Communauté européenne
+2 +28 °C	Limitation de la température
	Risque biologique

Fabricant

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Tél. : +1.408.541.4191
Fax : +1.408.541.4192

EC REP Représentant agréé

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tél. : +33.563.82.53.00
Fax : +33.563.82.53.01
Courrier électronique : cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Deutsch

Medizinisches Gerät zur *In-vitro*-Diagnostik

Markenname

Xpert® EV

Üblicher Name

Xpert EV-Test

Verwendungszweck

Beim Cepheid® Xpert EV-Test, der mit dem GeneXpert® Dx-System ausgeführt wird, handelt es sich um einen Test, bei dem mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) der mutmaßliche qualitative Nachweis von enteroviraler (EV) RNA in Proben zerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) von Personen mit Anzeichen und Symptomen von Meningitis geführt wird. Dieser Test kann in Verbindung mit anderen Laborergebnissen und klinischen Informationen unterstützend bei der Labordiagnose von enteroviralen Infektionen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Meningitis oder Meningoenzephalitis eingesetzt werden. Die Leistungsmerkmale des Tests wurden nicht für Patienten mit geschwächtem Immunsystem oder immunsupprimierte Patienten nachgewiesen.

VORSICHT: Die Ergebnisse des Xpert EV-Tests sollten lediglich ergänzend zu den klinischen Beobachtungen und den sonstigen dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen verwendet werden. Durch ein positives Xpert EV-Testergebnis werden andere Ursachen der Meningitis wie Bakterien, Mykobakterien, andere Viren (z. B. Viren aus der Herpesfamilie, Arboviren, Mumpsviren, etc.) oder Pilze nicht ausgeschlossen.

Zusammenfassung und Erklärung

Der Cepheid® Xpert EV-Test wird mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt und zum Nachweis von enteroviraler RNA in Proben zerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) eingesetzt. Der Begriff „Enterovirus" bezeichnet taxonomisch die Gruppe von Viren, die aus Polioviren, Coxsackieviren, Echoviren und Enteroviren besteht. [3] Enteroviren sind die Ursache vieler verschiedener Infektionen. Sehr häufig erfolgt ihre Verbreitung durch direkten Kontakt mit den respiratorischen Sekreten infizierter Personen.[1] In der Regel sind die Symptome Fieber, starke Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, schmerzende Augen bei hellem Licht, Schläfrigkeit oder Verwirrung sowie Übelkeit und Erbrechen. Bei Kleinkindern sind die Symptome u. a. Fieber, Gereiztheit bzw. Reizbarkeit, Schwierigkeiten beim Aufwachen und Appetitverlust.[1] Zwar sind die meisten Infektionen entweder asymptomatisch oder sie ziehen leichtere fiebrige Erkrankungen nach sich. Oftmals führen Sie jedoch bei den Patienten, insbesondere bei Kleinkindern und Kindern, zu einem Krankenhausaufenthalt. Etwa 90 % der Fälle viraler Meningitis werden von Enteroviren hervorgerufen,[2] und in den Vereinigten Staaten sind Enteroviren die häufigste Ursache der Meningitis mit schätzungsweise 30.000 bis 50.000 Krankenhauseinweisungen pro Jahr.[3] Die enterovirale Meningitis heilt normalerweise innerhalb von 7–10 Tagen von selbst aus. Meningitis mit nicht viralen Ursachen, wie beispielsweise die bakterielle Meningitis, kann jedoch ernst sein und zu Behinderungen oder zum Tod führen, wenn sie nicht sofort behandelt wird. Aus diesem Grund sollte die Meningitis ernst genommen werden.[1]

Ein Test zum Nachweis von Enteroviren kann, in Verbindung mit klinischen Beobachtungen und sonstigen klinischen Informationen, dazu beitragen, dass Ärzte Patienten mit enteroviraler Meningitis erkennen, sodass die Behandlung der Patienten unterstützt wird.[4]

Prinzipien der Prozedur

Das GeneXpert® Dx-System automatisiert und integriert die Probenvorbereitung, die Amplifizierung von Nukleinsäuren und die Detektion der Zielsequenz in einfachen und komplexen Proben mittels Echtzeit-PCR- und RT-PCR-Untersuchungen. Das System besteht aus einem Instrument und einem PC mit vorinstallierter Software, die zur Ausführung von Tests an entnommenen Proben und zur Anzeige der Ergebnisse dient. Das System sieht die Verwendung von GeneXpert®-Einwegkartuschen vor, die die PCR-Reagenzien enthalten und in denen der PCR-Prozess abläuft. Da die Kartuschen in sich abgeschlossen sind, werden Kreuzkontaminationen verhindert. Eine vollständige Beschreibung des Systems ist im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert® Dx-System zu finden*.

Der Xpert EV-Test ist zum Nachweis von enteroviraler (EV) RNA (enterovirales Genom 5' untranslatierte Region [UTR] zwischen Nukleotid 452 und 596) in CSF-Proben vorgesehen. Der Test arbeitet zum gleichzeitigen Nachweis von Nukleinsäuren in einer Zielsequeur in der EV-RNA und der Probenverarbeitungskontrolle/internen Kontrolle (SPC/IC) mit Reagenzien, Primern und Sonden. Er beinhaltet die SPC/IC, um eine angemessene Verarbeitung des Zielvirus sicherzustellen. Der Test kontrolliert, ob im RT-PCR-Test Inhibitoren vorhanden sind, um zu verhindern, dass es fälschlicherweise zu einem negativen Ergebnis kommt. (Bitte beachten Sie, dass in der Software des GeneXpert® Dx-Systems „CIC" die Bezeichnung für die SPC/IC ist.) Der Test umfasst ferner eine Kontrolle zur Sondenprüfung, welche die Rehydrierung der Reagenzien, die unversehrtheit der Sonden und die Befüllung des Reaktionsgefäßes in der Kartusche kontrolliert.

Zur Testdurchführung werden die CSF-Probe und vier Reagenzien in vorbezeichnete Kammern der Xpert EV-Kartusche gegeben. Das GeneXpert® DX-System führt die Probenvorbereitung durch Lysierung des Virus und der Probenverarbeitungskontrolle (Pseudovirus mit enkapsidierter RNA) durch, wodurch die RNA an die Suchmatrix bindet und eluiert wird. Die RNA wird mit RT-Trockenreagenzien gemischt und zur Vorbereitung der cDNA in das Reaktionsgefäß eingeleitet. Anschließend wird die cDNA mit PCR-Trockenreagenzien gemischt und zur Echtzeit-PCR bzw. zum Echtzeit-Nachweis in das Reaktionsgefäß übertragen. Mit den EV-Primern und der Sonde wird eine übereinstimmende Region der enteroviralen 5' untranslatierten Region (UTR) amplifiziert und nachgewiesen. Der Test dauert ca. 2,5 Stunden.

Reagenzien und Instrumente

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Das Xpert EV Test-Kit (GXEV-100N-10) enthält Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Proben. Das Kit enthält Folgendes:

Xpert EV-Kartuschen	**10 Kartuschen/Kit**
Kügelchen 1 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
• Reverse Transkriptase	
• RNase-Inhibitor	
• dNTPs	
• BSA (Rinderserum-Albumin)	
Kügelchen 2 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
• Rückwärts-Oligonukleotid-Primer	
• BSA (Rinderserum-Albumin)	
Kügelchen 3 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
• DNA-Polymerase	
• dNTPs	
• BSA (Rinderserum-Albumin)	
Kügelchen 4 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
• Vorwärts-Oligonukleotid-Primer	
• Mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotid-Sonden	
• BSA (Rinderserum-Albumin)	
Kügelchen 5 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
• Probenverarbeitungskontrolle (Pseudovirus mit enkapsidierter CIC-RNA)	
• BSA (Rinderserum-Albumin)	
Bindungsreagenz (1)	**10 × 1 ml**
• Ethanol	
• Wasser	
Waschreagenz (2)	**10 × 3,2 ml**
• Cysteamin-HCl	
• EDTA (Ethylenediamin-Tetraazetat)	
• KCl	
• MTG (Monothioglyzerin)	
• PEG (Polyethylenglycol)	
• Tris, pH 7,0	
• Tween 20	
• Wasser	

Elutionsreagenz (3) **10 × 2,0 ml**

- Ammoniumsulfat
- EDTA (Ethylenediamin-Tetraazetat)
- Tris, pH 7,0
- Wasser

Lysereagenz (4) **10 × 300 µl**

- N-Acetyl-L-Cystein
- Guanidin-Thiocyanat
- N-lauroylsarkosin
- Natriumcitrat, pH 6,8
- Wasser

Hinweis:

- Für alle Reagenzien dieses Tests sind Sicherheitsdatenblätter beim Technischen Support von Cepheid auf Anfrage erhältlich.
- Das Rinderserum-Albumin (BSA) in diesem Produkt wurde ausschließlich aus Rinderplasma hergestellt, das aus den USA stammt. Auch die Herstellung des BSA erfolgte in den USA. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

Lagerung und Handhabung

- Die Xpert EV-Kartuschen und -Reagenzien bei 2–28 °C lagern.
- Kartuschen dürfen erst unmittelbar vor Testdurchführung geöffnet werden.
- Die Kartuschen und Reagenzien sind innerhalb von 30 Minuten nach Öffnen der Verpackung zu verwenden.
- Kartuschen und Reagenzien, die das Verfallsdatum überschritten haben, dürfen nicht verwendet werden.
- Keine trüben oder farblosen Reagenzien verwenden.

Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- GeneXpert® Dx-System (die Katalognummer hängt von der Konfiguration ab): GeneXpert®-Instrument, Computer, Barcode-Lesegerät und Benutzerhandbuch
- Drucker (Kompatibilitätshinweise finden Sie im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert® Dx-System*.)
- Xpert EV-Test-CD-ROM (Teilenr. 950-0125)
- 200-µl-Pipette
- Sterile 200-µl-Pipettenspitzen

Warnungen und Vorsichtshinweise

- Nur zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Das Lysereagenz enthält Guanidin-Thiocyanat, welches hochreaktive Komponenten bilden kann, wenn es mit Bleiche vermischt wird. Sollten Flüssigkeiten verschüttet werden, die dieses Reagenz enthält, ist der Bereich mit Laborreinigungsmitteln und Wasser zu reinigen.
- Alle biologischen Proben und auch die Kartuschen sind als infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist zu bestimmen, welche Probe infektiös ist, sollten alle Proben vom Menschen mit den möglichen Sorgfaltsmaßnahmen behandelt werden. Die Richtlinien zum Umgang mit Proben sind bei der US-amerikanischen CDC (Center for Disease Control and Prevention[5], US-amerikanische staatliche Behörde für den Schutz der Bevölkerung vor Krankheiten und Seuchen) und beim Clinical and Laboratory Standards Institute (US-amerikanisches Institut für Standards in Klinik und Labor; früher National Committee for Clinical Laboratory Standards)[6] erhältlich.
- Alle gefährlichen oder biologisch kontaminierten Substanzen gemäß den Vorgehensweisen der jeweiligen Institution entsorgen. Alle Substanzen auf sichere und akzeptable Weise und gemäß den Bundes-, Landes- und kommunalen Vorschriften entsorgen.

Probensammlung und –transport

CSF in einem sterilen Behälter sammeln und gemäß den Richtlinien der jeweiligen Institution ins Labor transportieren. Proben bei 2–8 °C lagern oder einfrieren, falls der Test nicht innerhalb von 72 Stunden nach Entnahme durchgeführt wird. Die Proben dürfen maximal zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Es ist nicht empfehlenswert, die Proben zu zentrifugieren.

Prozedur

Vorsichtshinweise

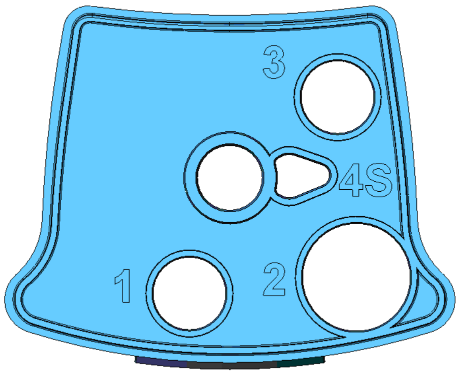
- Xpert EV-Reagenzien nicht durch andere Reagenzien ersetzen.
- Der Xpert EV-Kartuschendeckel darf nur geöffnet werden, um Proben- und Reagenzien hinzuzufügen.
- Eine Xpert EV-Kartusche, die nach dem Befüllen mit der Probe oder Reagenzien hinuntergefallen ist oder geschüttelt wurde, darf nicht in das Instrument geladen werden.
- Kartuschen mit beschädigtem Reagenzglas dürfen nicht geladen werden.
- Gebrauchte Xpert EV-Kartuschen nicht öffnen.
- Gebrauchte Xpert EV-Kartuschen nicht erneut verwenden.
- Die Proben dürfen maximal zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Keine zentrifugierten Proben verwenden.

Vorbereiten der Kartusche

Laden der Probe und der Reagenzien in die Kartusche (Abbildung 1):

1. Eine Kartusche und die Reagenzien aus der Verpackung nehmen.
2. Die Ampulle mit dem Bindungsreagenz (1) durch Drehen und Abbrechen der Kappe öffnen.
3. Die Spitze der Ampulle mit dem Bindungsreagenz (1) in die Kartuschenkammer 1 einsetzen und so lange auf die Ampulle drücken, bis der gesamte Inhalt geleert ist.
4. Die Ampulle mit dem Waschreagenz (2) durch Drehen und Abbrechen der Kappe öffnen.
5. Die Spitze der Ampulle mit dem Waschreagenz (2) in die Kartuschenkammer 2 einsetzen und so lange auf die Ampulle drücken, bis der gesamte Inhalt geleert ist.
6. Die Ampulle mit dem Elutionsreagenz (3) durch Drehen und Abbrechen der Kappe öffnen.
7. Die Spitze der Ampulle mit dem Elutionsreagenz (3) in die Kartuschenkammer 3 einsetzen und so lange auf die Ampulle drücken, bis der gesamte Inhalt geleert ist.
8. Mit der Pipette 140 µl Lysisreagenz (4) in die Kartuschenkammer 4S geben. Die Phiole mit dem Lysisreagenz (4) entsorgen.
9. Mit der Pipette 140 µl Probe in die Kartuschenkammer 4S geben. Um zu vermeiden, dass große Luftblasen entstehen, die Pipettenspitze über die Kammer halten und die Probe langsam pipettieren.
10. Den Kartuschendeckel schließen.

Wichtig: Sicherstellen, dass die Kartusche in das GeneXpert® Dx-Instrument geladen wurde, und den Test innerhalb von 30 Minuten nach Hinzufügung der Reagenzien starten.



1 = Bindungsreagenz
2 = Waschreagenz
3 = Elutionsreagenz
4S = Lysisreagenz und Probe

Abbildung 1. Xpert EV-Kartusche (Draufsicht).

Testbeginn

Wichtig: Vor Beginn des Tests ist sicherzustellen, dass die Definition des Xpert EV-Tests in die Software importiert wurde (für Anweisungen die Test-CD-ROM verwenden). Die Xpert EV-Test-CD-ROM erhalten Sie gegebenenfalls beim Technischen Support von Cepheid.

In diesem Abschnitt werden die Grundschritte der Testausführung beschrieben. Für genauere Anweisungen das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert® Dx-System* verwenden.

1. Den Computer und anschließend das GeneXpert® Dx-Instrument einschalten.
2. Auf dem Windows®-Desktop auf das Symbol GeneXpert® Dx doppelklicken.
3. Mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert® Dx-Systemsoftware anmelden.
4. Im Fenster GeneXpert® Dx System auf **Create Test** (Test erstellen) klicken. Daraufhin wird das Dialogfeld Scan Cartridge Barcode (Probenbehälter-Strichcode scannen) angezeigt.
5. Den Strichcode der Xpert EV-Kartusche einscannen. Das Fenster **Create Test** (Test erstellen) wird geöffnet. Mithilfe der Strichcodeinformationen gibt die Software automatisch Daten in die folgenden Felder ein: **Select Assay** (Test auswählen), **Reagent Lot ID** (Reagenzienchargen-ID), **Cartridge SN** (Kartuschen-SN) und **Expiration Date** (Verfallsdatum).
6. Die **Sample ID** (Proben-ID) in das Feld einscannen oder -tippen. Die Proben-ID hängt mit den Testergebnissen zusammen und wird im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) und in allen Berichten angezeigt.
7. Auf **Start Test** (Test starten) klicken. Das Kennwort in das angezeigte Dialogfeld eingeben.
8. Die Tür des Instrumentenmoduls mit der grün blinkenden Anzeige öffnen und die Kartusche laden.
9. Das Modul schließen. Darauf achten, dass die Anzeige ununterbrochen grün leuchtet.
10. Wenn der Test abgeschlossen ist, erlischt die Anzeige des Instrumentenmoduls.
11. Die Modultür kann erst geöffnet und die Kartusche entnommen werden, wenn das System die Tür entriegelt hat.
12. Bei der Entsorgung der Kartusche die Sicherheitsrichtlinien des Labors beachten.

Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

Siehe das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert® Dx-System* für genaue Informationen zum Anzeigen und Drucken der Ergebnisse.

CONTROL Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle ist gemäß den kommunalen, Landes- und/oder Bundesvorschriften bzw. gemäß den Akkreditierungsanforderungen und den Qualitätskontrollrichtlinien des jeweiligen Labors durchzuführen.

Jeder Test umfasst zwei interne Kontrollen zur Validierung des Tests, und zwar die Probenverarbeitungskontrolle/interne Kontrolle und die Sondenprüfung. Die Testproben werden wie folgt kontrolliert:

- **Probenverarbeitungskontrolle/Interne Kontrolle (SPC/IC)** – Bei der SPC/IC handelt es sich um einen Pseudovirus mit enkapsidierter RNA in Form eines Trockenkügelchens, das Bestandteil jeder Kartusche ist. Bei der SPC/IC wird die

Angemessenheit der Lysis Zielsequencer des EV und der Probenverarbeitung überprüft. Ferner werden Teststörfaktoren festgestellt.

Sie wird mit der Probe vermischt, um die angemessene Probenverarbeitung zu kontrollieren und die Integrität des RT-PCR-Tests zu überwachen. Die SPC/IC gilt als bestanden, wenn sie die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt. Bitte beachten Sie, dass in der Software des GeneXpert® Dx-Systems „CIC" die Bezeichnung für die SPC/IC ist.

- **Sondenprüfung** – Vor Beginn der PCR-Reaktion führt das System sowohl an der EV-Zielsequenz als auch an der SPC/IC eine Sondenprüfung durch, um die Rehydrierung der Reagenzkügelchen und die Befüllung des Reaktionsgefäßes zu überprüfen. Eine Sondenprüfung gilt als bestanden, wenn sie die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt.
- **Externe Kontrollen** – Externe Kontrollen müssen für Schulungen, Leistungstests und externe Qualitätskontrollen des GeneXpert® Dx-System verwendet werden. Externe Kontrollen sollten je nach Anwendungsgebiet nach Maßgabe der anerkannten Akkreditierungsorganisationen auf kommunaler, Landes- oder Bundesebene verwendet werden. Externe Kontrollen können durch Verdünnung von Coxsackievirus A9, Stamm Bozek oder Coxsackievirus A6, Stamm C.G. (Gdula) mit CSF von Patienten, die bekanntermaßen negativ sind, oder mit synthetischer CSF (z. B. SeraCare Life Sciences Inc., Katalognummer HSP-515) zu etwa 10-1.000 TCID50/ml bereitet werden, was einen EV Ct-Bereich von 32-35 für den Xpert EV-Test ergibt.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind im GeneXpert® Dx-System im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) verfügbar. In diesem Kapitel werden die möglichen Ergebnisse beschrieben.

Hinweis: Im GeneXpert® Dx-System wird im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) die SPC/IC in der Spalte **Analyte Name** (Analytname) als „CIC“ angezeigt.

VORSICHT: Die Ergebnisse des Xpert EV-Tests sollten lediglich ergänzend zu den klinischen Beobachtungen und den sonstigen dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen verwendet werden. Durch ein positives Xpert EV-Testergebnis werden andere Ursachen der Meningitis wie Bakterien, Mykobakterien, andere Viren (z. B. Viren aus der Herpesfamilie, Arboviren, Mumpsviren, etc.) oder Pilze nicht ausgeschlossen.

POSITIVE (POSITIV) (Abbildung 2)

Es wurde EV-Nukleinsäure nachgewiesen (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System. Die SPC/IC wird als „CIC“ angezeigt.):

- EV – POS
- CIC (SPC/IC) – KA (Wenn der Enterovirus-Titer hoch ist, wird die RT-PCR für die SPC u. U. unterdrückt.)
- Sondenprüfung – PASS (BESTANDEN)
- **Durch ein positives Xpert EV-Testergebnis werden andere Ursachen der Meningitis wie Bakterien, Mykobakterien, andere Viren (z. B. Viren aus der Herpesfamilie, Arboviren, Mumpsviren, etc.) oder Pilze nicht ausgeschlossen.**

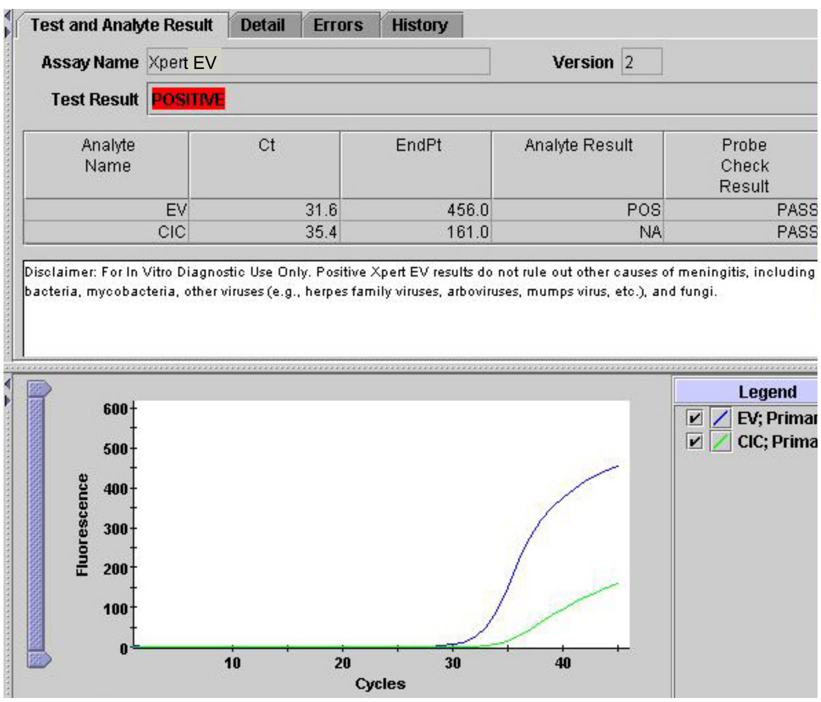


Abbildung 2. Positives Ergebnis (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System. Die SPC/IC wird als „CIC“ angezeigt.)

NEGATIVE (NEGATIV) (Abbildung 3)

Es wurde keine EV-Nukleinsäure nachgewiesen, aber die SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System. Bitte beachten Sie, dass

die SPC/IC als „CIC" angezeigt wird.):

- EV – NEG
- CIC (SPC/IC) – PASS (BESTANDEN)
- Sondenprüfung – PASS (BESTANDEN)
- **Ein negatives Xpert EV-Ergebnis schließt Enteroviren nicht als Ursache für Meningitis aus; Enteroviren wurden lediglich nicht nachgewiesen.**

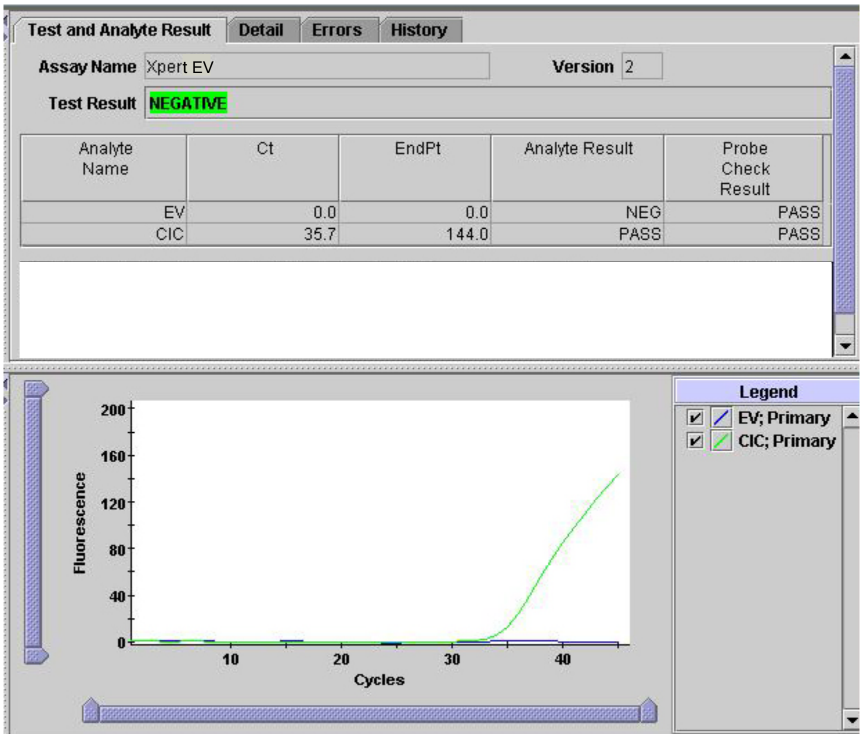


Abbildung 3. Negatives Ergebnis (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System. Bitte beachten Sie, dass die SPC/IC als „CIC" angezeigt wird.)

INVALID (UNGÜLTIG) (Abbildung 4)

Es kann nicht ermittelt werden, ob EV-Nukleinsäure vorhanden ist oder nicht. Test mit zusätzlicher Probe wiederholen. Die SPC/IC erfüllt die Akzeptanzkriterien nicht, die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR ist gehemmt (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System). Bitte beachten Sie, dass die SPC/IC als „CIC" angezeigt wird.):

- EV – INVALID (UNGÜLTIG)
- CIC (SPC/IC) – FAIL (NICHT BESTANDEN)
- Sondenprüfung – PASS (BESTANDEN)

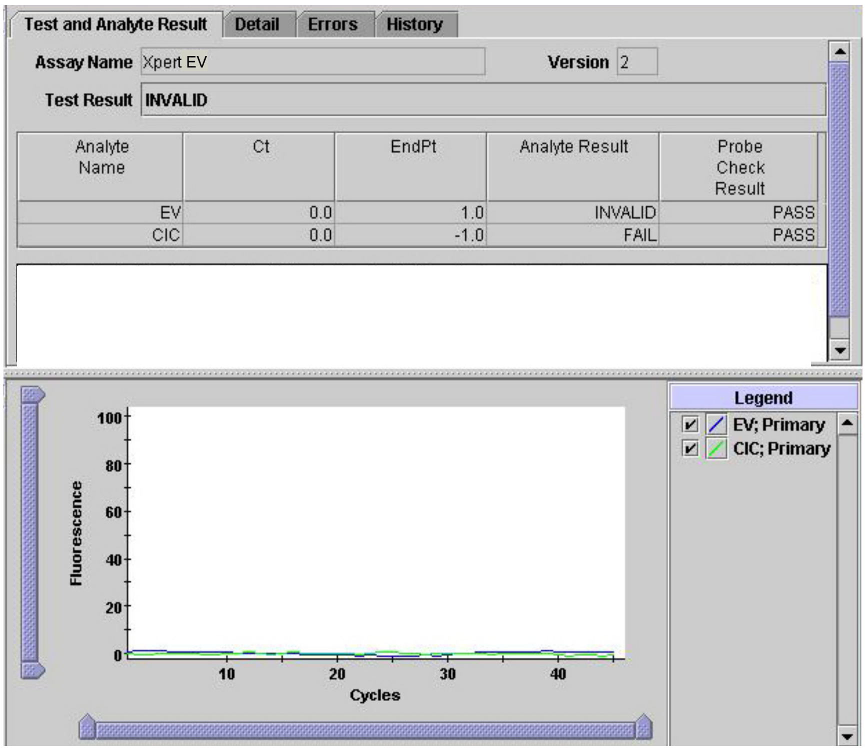


Abbildung 4. Ungültiges Ergebnis (Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) im GeneXpert® Dx-System. Bitte beachten Sie, dass die SPC/IC als „CIC" angezeigt wird.)

ERROR (FEHLER)

Es kann nicht ermittelt werden, ob EV-Nukleinsäure vorhanden ist oder nicht. Test mit zusätzlicher Probe wiederholen. Die Sondenprüfungskontrolle ist wahrscheinlich bedingt dadurch fehlgeschlagen, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt, ein Problem mit der Sondenintegrität festgestellt oder der Test abgebrochen wurde:

- EV – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- CIC (SPC/IC) – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Probe Check – FAIL (Sondenprüfung FEHLGESCHLAGEN)

NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)

Es kann nicht ermittelt werden, ob EV-Nukleinsäure vorhanden ist oder nicht. Test mit zusätzlicher Probe wiederholen. Die erfassten Daten reichen für ein Testergebnis nicht aus (beispielsweise hat der Bediener den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war):

- EV – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- CIC (SPC/IC) – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Sondenprüfung – KA

Gründe für eine Wiederholung des Tests

Test mit einer frischen Probe wiederholen, wenn die folgenden Ergebnisse generiert werden:

- Das Ergebnis INVALID (UNGÜLTIG) weist darauf hin, dass die SPC/IC-Kontrollen fehlgeschlagen sind. Die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR ist gehemmt.
- Das Ergebnis ERROR (FEHLER) weist darauf hin, dass die Sondenprüfungskontrolle fehlgeschlagen ist und dass der Test abgebrochen wurde, und zwar wahrscheinlich bedingt dadurch, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt, ein Problem mit der Sondenintegrität festgestellt oder der Maximaldruck überschritten wurde.
- Das Ergebnis NO RESULT (KEIN ERGEBNIS) weist darauf hin, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise hat der Bediener den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war.

Einschränkungen

- Ergebnisse des Xpert EV-Tests sollten unter Berücksichtigung anderer Labor- und klinischer Daten interpretiert werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen. Bei einem positiven Xpert EV-Testergebnis ist nicht auszuschließen, dass andere Krankheitserreger wie Bakterien in der CSF vorliegen. Wie auch bei molekularen Tests besteht immer die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse. In der Literatur wird von seltenen Meningitisfällen berichtet, die sowohl durch Bakterien als auch durch Viren hervorgerufen werden.[7, 8, 9]
- Die Leistung des Xpert EV-Tests wurde nur anhand der mit dem Cepheid GeneXpert® Dx-System durchgeführten Prozeduren geprüft, die in der Packungsbeilage beschrieben sind. Diese Prozeduren sollten nicht geändert werden, da dadurch die Leistung des Tests beeinträchtigt werden könnte.
- Der Xpert EV-Test ist nur zum Nachweis von Enteroviren vorgesehen. Bei einem negativen Testergebnis ist das Vorhandensein von Enteroviren nicht auszuschließen. Dieser Test schließt nicht die Möglichkeit einer durch Herpesviren oder durch Pilze hervorgerufenen Meningitis aus; um diese Infektionen ausschließen zu können, sind weitere Tests erforderlich.

⚠ **VORSICHT:** **Wie auch bei anderen Diagnoseverfahren sollten die Ergebnisse des Xpert EV-Tests lediglich ergänzend zu den klinischen Beobachtungen und den sonstigen dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen verwendet werden. Durch ein positives Xpert EV-Testergebnis werden andere Ursachen der Meningitis wie Bakterien, Mykobakterien, andere Viren (z. B. Viren aus der Herpesfamilie, Arboviren, Mumpsviren, etc.) oder Pilze nicht ausgeschlossen.**

Hemmstoffe

Es wurden Studien mit potenziellen Hemmstoffen durchgeführt, die in CSF vorliegen. Getestet wurden Leukozyten, Protein, Vollblut und Hämoglobin. Der Leukozytengehalt wurde unter Verwendung von mit CSF versetzten Leukozyten (humane K562-Leukämiezellen) getestet.

Um einer potenziellen Beeinträchtigung durch das Eindringen von Blut gerecht zu werden, wurden Proben humaner CSF getestet, die mit verschiedenen Erythrozytenkonzentration (bis zu 125.000 Erythrozyten/mm^3) kontaminiert waren.

Die Konzentrationsbereiche und die Hemmstoffe in normaler CSF sind in Tabelle 1a aufgeführt. Ferner sind hier die bei einer Meningitis in der CSF nachgewiesenen potenziellen Bereiche angegeben. Jede Substanz wurde mit verschiedenen Konzentrationen versetzt, die bei normalen und Meningitispatienten anzutreffen sind.

Alle Tests wurden mit CSF durchgeführt, die mit dem Enterovirus-Serotyp CVA9 in der Dosis 80 $TCID_{50}$/ml (~3x LOD) versetzt war.

Tabelle 1a. Proben von in Xpert EV getesteten potenziellen endogenen Hemmstoffen.

Substanz	In normaler CSF nachgewiesener Konzentrationsbereich	Potenzieller Konzentrationsbereich in CSF (bei Meningitis)	Mit Xpert EV getestete Probe	Getestete Konzentrationen
Leukozyten	0–5 Zellen/mm^3	5–5.000 Zellen/mm^3	K562-Zellen	Zellen/mm^3: 0, 3,57, 35,7, 357, 7140
CSF-Proteine	13–40 mg/dl	15–217 mg/dl	BSA: IgG (Verhältnis 1:1)	Proteinkonzentration mg/dl 0, 30, 300, 1,071
Blut	Keiner	Nicht zutreffend	Humane CSF versetzt mit Blut (14)	0 % bis ca. 2,5 % v/v Blut
Hämoglobin	Erythrozyten 12–18 g/dl	Nicht zutreffend, es sei denn, es ist Blut eingedrungen	Hämoglobin (Eisenpulver) versetzt mit CSF	HgB g/dl 0, 0,36, 0,71, 2,14, 3,6 [Stellt ca. v/v Blut in CSF dar, bzw.: 0 %, 2,5 %, 5 %, 15 %, 25 %]

Wie in Tabelle 1b dargestellt, gab es bei den Tests zum Nachweis von Enteroviren Ergebnisse, die selbst dann positiv waren, wenn ein Höchstmaß an potenziellen Hemmstoffen in den Test eingeleitet wurde.

Tabelle 1b. Ergebnisse von Studien mit in Xpert EV getesteten potenziellen endogenen Hemmstoffen.

Hemmstoff	Konzentration	EV C_t
Keine (Kontrolle n = 8)	Nicht zutreffend	36,1
Protein (n = 4)	1.071 mg/dl	38,2
Leukozyten (n = 4)	7.140 Zellen/mm^3	37,2
Eingedrungenes Blut, Probe 1	2,5 % v/v Blut	35,9
Eingedrungenes Blut, Probe 2	2,5 % v/v Blut	35,0
Eingedrungenes Blut, Probe 3	2,5 % v/v Blut	35,3
Hämoglobin (n = 4)	3,6 g/dl	36,9

Leistungsmerkmale

Klinische Leistung

Die Leistungsmerkmale des Xpert EV-Tests wurden in einer multizentrischen Forschungsstudie an sechs Institutionen festgelegt.

Für die Teilnahme an der Studie war es erforderlich, dass der behandelnde Arzt für den Patienten aufgrund von Meningitissymptomen eine Lumbalpunktion und einen EV-Test und/oder Viruskulturtest angeordnet hatte. Der Patient musste ausreichend überschüssiges CSF-Volumen (mindestens 0,5 ml) aufweisen und ggf. nach umfassender Information schriftlich sein Einverständnis erklärt haben. Patientenproben wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn die CSF für den Nukleinsäuretest zentrifugiert wurde oder der Xpert EV-Test und die Tests für den klinischen Nachweis nicht innerhalb desselben Gefrier-Auftauzyklus der Probe durchgeführt wurden. Auch die klinische Historie der Patienten wurde berücksichtigt: Klinische Anzeichen und Symptome; Anzahl der Tage seit dem Einsetzen der Symptome; maximale Körpertemperatur; Kontakthistorie; CSF Erythrozyten, Leukozyten und Differential; CSF Glukose und Total Protein; CSF Bakterienkultur und Gram-Färbung; Blutglukose; Viruskultur aus anderen Proben, sofern verfügbar.

Laut Definition leidet ein Patient an EV-Meningitis (klinische Diagnose), wenn folgende Kriterien erfüllt sind: Klinische Befunde sind konsistent mit Meningitis, Laborergebnisse für CSF-Gram-Färbung, CSF-Bakterienkultur, CSF-Glukose, CSF-Blutglukoseverhältnis, CSF-Gesamtproteinkonzentration, CSF-Leukozytenanzahl und entweder Nachweis von EV-Genom in der CSF und/oder positive CSF-EV-Kultur.

Anfänglich wurden 475 Patienten für eine Teilnahme in Betracht gezogen. Einundvierzig Patienten erfüllten die Kriterien für eine Teilnahme an der Studie nicht und wurden in der Folge von der Analyse ausgeschlossen, sodass 434 zu analysierende Patienten übrig blieben, von denen 255 Ergebnisse aller oben beschriebenen Tests aufwiesen.

Tabelle 2a. Auswertung prospektiver klinischer Proben gegenüber der „Klinischen Diagnose“

Insgesamt nahmen 199 geeignete prospektive Patienten teil, 133 Patienten wiesen die 6 Laborergebnisse für den „klinischen Nachweis“ auf. Die klinischen Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten des Xpert EV-Tests sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

		Klinische Diagnose[1]	
		+	–
Xpert EV	+	26	3
	–	1	103
Insgesamt		**27**	**106**

Klinische Sensitivität: 96,3 % (26/27); 95 % CI 81,0–99,9 %
Klinische Spezifität: 97,2 % (103/106); 95 % CI 91,9–99,4 %

Tabelle 2b. Auswertung von konservierten prospektiv gesammelten klinischen Proben gegenüber der „Klinischen Diagnose“

Insgesamt nahmen 235 geeignete retrospektive Patienten teil, 122 Patienten wiesen die 6 Laborergebnisse für den „klinischen Nachweis“ auf. Die klinischen Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten des Xpert EV-Tests sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

		Klinische Diagnose[1]	
		+	–
Xpert EV	+	23	3
	–	0	96
Insgesamt		**23**	**99**

[1] Laut Definition leidet ein Patient an EV-Meningitis (klinische Diagnose), wenn folgende Kriterien erfüllt sind: Klinische Befunde sind konsistent mit Meningitis, Laborergebnisse für CSF-Gram-Färbung, CSF-Bakterienkultur, CSF-Glukose, CSF-Blutglukoseverhältnis, CSF-Gesamtproteinkonzentration, CSF-Leukozytenanzahl und Nachweis von EV-Genom in der CSF oder positive CSF-EV-Kultur.

Klinische Sensitivität: 100 % (23/23); 95 % CI 85,2–100 %
Klinische Spezifität: 97,0 % (96/99); 95 % CI 91,4–99,4 %

Tabelle 2c. Klinische Leistung des Xpert EV-Tests im Zusammenhang mit der „Klinischen Diagnose“ nach Alter.

Die 133 prospektiven klinischen Proben und die 122 konservierten prospektiv gesammelten klinischen Proben wurden jeweils nach Alter gruppiert. Die klinische Sensitivität und Spezifität der einzelnen Altersgruppen ergeben sich aus der folgenden Tabelle.

	Prospektive klinische Proben		Konservierte prospektiv gesammelte klinische Proben	
Alter	**Klinische Sensitivität**	**Klinische Spezifität**	**Klinische Sensitivität**	**Klinische Spezifität**
Neugeborene (maximal 2 Monate alt)	100,0 % (14/14)	96,0 % (24/25)	100,0 % (4/4)	90,0 % (18/20)
Kinder (zwischen 2 Monaten und 17 Jahren)	92,3 % (12/13)	97,2 % (69/71)	100,0 (14/14)	98,1 % (51/52)
Erwachsene (18 Jahre und älter)	(0/0)	100,0 % (10/10)	100,0 % (5/5)	100,0 % (27/27)
Insgesamt	96,3 % (26/27)	97,2 % (103/106)	100 % (23/23)	97,0 % (96/99)

Bei 73,7 % (320/434) der geeigneten Proben wurden Viruskulturen angesetzt; bei den verbleibenden reichte die CSF für eine Kultivierung nicht aus. CSF-Proben von 263 Patienten mit ausreichend überschüssigem Volumen wurden zur Kultivierung der Viren an ein im Voraus bestimmtes Zentrallabor geschickt. Ferner wurden von Proben von 114 Patienten in den Studieneinrichtungen selbst Viruskulturen angesetzt. Von diesen 114 Patienten entwickelten sich bei 57 sowohl in den Studieneinrichtungen als auch im Zentrallabor Viruskulturen. 56 der 57 Patienten wiesen übereinstimmende Kulturergebnisse auf; bei einem Patienten wichen die Kulturergebnisse vor Ort von den Kulturergebnissen des Zentrallabors ab.

Das Zentrallabor verwendete zur Ansetzung der Viruskulturen Super E-Mix-Shell-Phiolen und die Zellen wurden mit Enterovirusantikörper (Pan) gefärbt. Die Zellen, bei denen der Pan-Enterovirusantikörper positiv war, wurden zudem zur Identifizierung der Enteroviren mit indirektem Immunfluoreszenz-Antikörper gefärbt. Die Studieneinrichtungen wandten bei der Ansetzung der Viruskulturen ihre jeweiligen Standardverfahren an.

Tabelle 3a. Auswertung prospektiver klinischer Proben gegenüber der Viruskultur

Von den 199 geeigneten prospektiven Proben wiesen 131 bei der Viruskultur Ergebnisse auf. Bei den Viruskulturen gab es zwischen den Studieneinrichtungen und dem Zentrallabor keine voneinander abweichenden Ergebnisse. Die positiven und negativen Übereinstimmungen zwischen dem Xpert EV und der Viruskultur sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

		Viruskultur	
		+	**–**
Xpert EV	+	8	13
	–	0	110
Insgesamt		8	123

Positive Übereinstimmung: 100,0 % (8/8); 95 % CI 63,1–100,0 %
Negative Übereinstimmung: 89,4 % (110/123) CI 82,65–94,3 %

Tabelle 3b. Auswertung von konservierten prospektiv gesammelten klinischen Proben gegenüber der Viruskultur

Von den 235 geeigneten retrospektiven Proben wiesen 211 bei der Viruskultur Ergebnisse auf. Die positiven und negativen Übereinstimmungen zwischen dem Xpert EV und der Viruskultur sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

		Viruskultur	
		+	–
Xpert EV	+	22	35
	–	1	153
Insgesamt		23	188

Positive Übereinstimmung: 95,7 % (22/23); 95 % CI 78,1–99,9 %
Negative Übereinstimmung: 81,4 % (153/188); 95 % CI 75,1–86,7 %

Tabelle 4. Für Xpert EV erwartete Werte bei den Personen, deren Anzeichen und Symptome auf eine Meningitis hinwiesen

Die 434 geeigneten Patienten wurden nach Alter und Geschlecht gruppiert. Die Zahl und der prozentuale Anteil der positiven Fälle wurden ermittelt und in der folgenden Tabelle dargestellt.

		Xpert EV-Ergebnis		
Alter (Jahre)	Geschlecht	**Positiv n (%)**	**Negativ n (%)**	**Insgesamt**
< 1	M	34 (29,3)	82 (70,7)	116
	F	26 (28,3)	66 (71,7)	92
1–5	M	8 (25,0)	24 (75,0)	32
	F	3 (11,1)	24 (88,9)	27
6–10	M	3 (31,4)	24 (68,6)	35
	F	3 (17,6)	14 (82,4)	17
11–15	M	8 (33,3)	16 (66,7)	24
	F	3 (15,0)	17 (85,0)	20
16–21	M	3 (20,0)	12 (80,0)	15
	F	3 (25,0)	9 (75,0)	12
>21	M	2 (10,0)	18 (90,0)	20
	F	3 (12,5)	21 (87,5)	24
Insgesamt		107 (24,7)	327 (75,3)	434

Analytische Reaktivität/Enterovirus-Serotyp – Testverfahren

Insgesamt wurden 60 Enterovirus-Serotypen mit dem Xpert EV-Test getestet. Für jeden Serotyp wurde der Virusüberstand unter Anwendung der angenommenen Nachweisgrenze in drei Replikaten verdünnt. Die Verdünnungen wurden mit gepoolten humanen EV-negativen Proben durchgeführt. Die geschätzte analytische Sensitivität ist in der folgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Geschätzte analytische Sensitivität.

Es wurden sechzig Serotypen getestet; die geschätzte $TCID_{50}$/ml, die in diesen Serotypen nachgewiesen werden kann, ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Spezies	Serotyp	Geschätzte $TCID_{50}$/ml
A	Coxsackie A3	5,01
A	Coxsackie A5	12,59
A	Coxsackie A6	12,59
A	Coxsackie A7	3,33
A	Coxsackie A10	2,81
A	Coxsackie A12	19,95
A	Coxsackie A14	0,10
A	Coxsackie A16	0,002
A	EV 71	0,16
B	Coxsackie A9	20,00
B	Coxsackie B1	4,00
B	Coxsackie B2	0,20
B	Coxsackie B3	0,028
B	Coxsackie B4	0,40
B	Coxsackie B5	0,04
B	Coxsackie B6	0,01
B	Echo 1	0,10
B	Echo 2	0,032
B	Echo 3	200,00
B	Echo 4	0,00032
B	Echo 5	0,032
B	Echo 6	200,00
B	Echo 7	2,00
B	Echo 8	0,10
B	Echo 9	2,00
B	Echo 11	40,00
B	Echo 12	1,58
B	Echo 13	0,01
B	Echo 14	0,0005
B	Echo 15	0,0032
B	Echo 16	0,0005
B	Echo 17	0,05
B	Echo 18	0,0002
B	Echo 19	2,51
B	Echo 20	0,032
B	Echo 21	1,00
B	Echo 24	0,02
B	Echo 25	0,50
B	Echo 26	0,032
B	Echo 27	0,00032
B	Echo 29	5,01
B	Echo 30	0,01
B	Echo 31	0,0032
B	Echo 32	0,10
B	Echo 33	0,05
B	EV 69	0,0002
C	Coxsackie A11	0,11
C	Coxsackie A13	13,27
C	Coxsackie A15	0,0032
C	Coxsackie A17	1,58
C	Coxsackie A18	0,02
C	Coxsackie A19	0,03
C	Coxsackie A20	0,002
C	Coxsackie A21	0,03
C	Coxsackie A22	0,02
C	Coxsackie A24	0,10
D	EV 68	199,53
D	EV 70	2,00
Poliovirus	Poliovirus 1	2,00
Poliovirus	Poliovirus 2	0,40
Poliovirus	Poliovirus 3	20,00

Analytische Spezifität

Die beim Xpert EV-Test verwendeten Primer- und Sondensequenzen dienen nicht zum Nachweis von Nukleinsäuren, die aus den folgenden Organismen extrahiert wurden, die meningitisähnliche Symptome hervorrufen: EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, AdV-2, Masern, Mumps, Parainfluenza 1-3, Influenza A, Influenza B, VZV, CMV, Streptokokken der Gruppe B , *Haemophilus influenzae* B, *H. influenzae* Non-B, *Escherichia coli, Neisseria meningitides, Citrobacter freundii* und *Citrobacter koseri.* Auch hat der Xpert EV-Test bei der Verarbeitung „ganzer Organismen" der aufgeführten Krankheitserreger durch die Xpert EV-Kartusche keine nachweisbaren Amplikone erzeugt. In der folgenden Tabelle sind die getesteten Organismen und ihre jeweilige Konzentration aufgeführt.

Tabelle 6. Analytische Spezifität des Xpert EV-Tests.

Im Xpert EV-Test wurden ganze Organismen auf ihre Spezifität hin getestet; die getesteten Konzentrationen der Organismen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Organismus	Anzahl der Organismen/Test
HHV-6	3,1 x 10^6 Partikel
HHV-7	1,4 x 10^7 Partikel
CMV	700 $TCID_{50}$
EBV	140 $TCID_{50}$
HSV-1	1,4 x 10^5 $TCID_{50}$
HSV-2	1,4 x 10^5 $TCID_{50}$
AdV-2	1,4 x 10^{12} $TCID_{50}$
Masern	700 $TCID_{50}$
Mumps	1,4 x 10^4 $TCID_{50}$
Parainfluenza 1	1,4 x 10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 2	7 x 10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 3	1,4 x 10^4 $TCID_{50}$
Influenza A	3,5 x 10^4 $TCID_{50}$
Influenza B	3,5 x 10^4 $TCID_{50}$
VZV	14 $TCID_{50}$
Streptokokken der Gruppe B	7 x 10^6 Zellen
H. influenzae B	7 x 10^6 Zellen
H. influenzae Non-B	7 x 10^5 Zellen
E.coli	7 x 10^6 Zellen
N. meningitides	7 x 10^6 Zellen
C. freundii	7 x 10^6 Zellen
C. koseri	7 x 10^6 Zellen

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze (Limit Of Detection, LOD) wird als die geringste Konzentration bzw. die geringste Menge eines Analyts definiert, bei der durch Laboranalyse nachgewiesen wurde, dass sie reproduzierbar mit einer Zuverlässigkeit von 95 % von einer negativen Probe unterschieden werden kann. Die Verdünnungen wurden mit gepoolten humanen EV-negativen Proben durchgeführt. Zur statistisch zuverlässigen Ermittlung der LOD wurden 20 Replikate sowie 20 EV-negative Proben ausgeführt. Die Proben bestanden aus Coxsackievirus A6 (CVA6), Coxsackievirus A9 (CVA9), Coxsackievirus A17 (CVA17), Enterovirus 70 (EV70) und Poliovirus 1 (PV1). Nicht alle 63 Serotypen wurden in statistisch signifikanter Zahl ausgeführt, da die Primer- und Sondenbindungsstellen bei allen Serotypen erhalten bleiben und die Amplikonlänge bei allen Serotypen identisch ist, sodass davon auszugehen ist, dass die Amplifizierungseffizienz bei allen Serotypen dieselbe ist. Die fünf oben genannten Serotypen wurden stellvertretend für die einzelnen Enterovirenarten CVA6 (A), CVA9 (B), CVA17 (C), EV70 (D) und PV1 (Poliovirus) ausgewählt.

Tabelle 7. Nachweisgrenze der fünf (5) Serotypen.

In der folgenden Tabelle sind die Nachweisgrenzen der fünf (5) Serotypen zu den verschiedenen Enterovirenarten aufgeführt.

Serotyp	Nachweisgrenze (LOD) ($TCID_{50}$/ml)
CVA9	80,0
EV70	1,3
PV1	4,0
CVA17	1,0
CVA6	33,0

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde in einer multizentrischen blinden Studie mit einer Genauigkeitsauswahl von vier Proben geprüft. Drei Standorte testeten jede Auswahlgruppe an 10 Testtagen dreimal pro Tag, sodass insgesamt 90 Ergebnisse pro Probengruppe vorlagen. Die Genauigkeitsauswahl bestand aus einer negativen Probe und drei positiven Proben, die jeweils einen mit synthetischem CSF versetzten spezifischen EV-Serotypen in einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze enthielten.

Tabelle 8. Zusammenfassung der Reproduktionsergebnisse.

In der folgenden Tabelle sind die prozentuale Übereinstimmung, die durchschnittlichen Ct-Werte zu jeder Konzentration, die verbundenen Standardabweichungen, der prozentuale Abweichungskoeffizient der multizentrischen Reproduzierbarkeitsstudie zwischen den verschiedenen Tagen und den verschiedenen Standorten dargestellt.

Anzahl der korrekt klassifizierten Proben					Zwischen den Tagen		Zwischen den Standorten		Insgesamt	
Serotyp ($TCID_{50}$/ml)	Standort 1	Standort 2	Standort 3	Mittlerer EV-Ct	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Negativ	30/30	30/30	30/30							
CVA6 (134)	30/30	30/30	29/29[1]	35,0	0,343	0,98 %	0,175	0,50 %	1,101	3,15 %
CVA9 (320)	30/30	30/30	30/30	34,4	0	0,00 %	0	0,00 %	0,61	1,77 %
CVA17 (3)	30/30	30/30	29/29[1]	33,8	0	0,00 %	0	0,00 %	0,414	1,22 %
Gesamtübereinstimmung	120/120	120/120	118/118							
Übereinstimmung in %	100,00 %	100,00 %	100,00 %							

[1] Bei zwei Proben wurde kein GeneXpert®-Ergebnis erzielt.

Um dem System zusätzlich Nachdruck zu verleihen, wurde eine zweite Studie durchgeführt. Über vier Tage wurde eine interne Reproduzierbarkeitsstudie mit mehreren GeneXpert®-Instrumenten (31) und ICORE-Modulen (121) durchgeführt. Zwei repräsentative Whole-Virus-Subtypen (d. h. Coxsackievirus CVA9 und Enterovirus EV70) wurden zur Erzeugung simulierter Proben mit zweifacher und vierfacher LOD mit negativer humaner CSF versetzt. Die negative Probe wurde 20 Mal getestet, während zwei positive Proben in beiden Konzentrationen fünfmal (5x) pro Tag getestet wurden. Unter allen getesteten Proben lauteten die Ergebnisse gemäß den Definitionen der Softwaresteuerung des Instruments bei zwei Proben „Invalid" (Ungültig) und bei drei Proben „No Result" (Kein Ergebnis). Von den 157 verwertbaren Ergebnissen waren 155 korrekt klassifiziert.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten Reproduktionsstudie.

In der folgenden Tabelle sind das Maß an Übereinstimmung, die durchschnittlichen Ct-Werte zu jeder Konzentration, die verbundenen Standardabweichungen und der prozentuale Abweichungskoeffizient für jeden Tag dargestellt.

Proben-ID		**Gesamtübereinstimmung – C_t-Ergebnisse**					**Prozentuale Gesamtübereinstimmung**
		Tag 1	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**	**Alle Tage**	
Negativ	Gesamtübereinstimmung	20/20	18/18[1]	20/20	20/20	78/78	100 %
	Durchschnitt	KA	KA	KA	KA	KA	
	SD	KA	KA	KA	KA	KA	
	% CV	KA	KA	KA	KA	KA	
CA9 2X LOD	Gesamtübereinstimmung	4/5[2]	5/5	4/5[2]	5/5	18/20	90 %
	Durchschnitt	36,65	36,54	36,53	36,54	36,56	
	SD	0,56	0,46	0,21	0,69	0,48	
	% CV	1,53 %	1,26 %	0,57 %	1,89 %	1,31 %	
CA9 4X LOD	Gesamtübereinstimmung	5/5	5/5	5/5	4/4[3]	19/19	100 %
	Durchschnitt	34,98	35,56	35,52	35,03	35,28	
	SD	0,53	0,67	0,7	0,3	0,6	
	% CV	1,52 %	1,88 %	1,97 %	0,86 %	1,70 %	
EV70 2X LOD	Gesamtübereinstimmung	5/5	5/5	5/5[4]	5/5	20/20	100 %
	Durchschnitt	37,38	37,3	37,55	36,88	37,2	
	SD	1,78	0,74	2,01	0,81	1,3	
	% CV	4,76 %	1,98 %	5,35 %	2,20 %	3,49 %	
EV70 4X LOD	Gesamtübereinstimmung	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100 %
	Durchschnitt	36,50	36,60	36,12	35,94	36,29	
	SD	0,58	0,97	0,29	0,84	0,72	
	% CV	1,59 %	2,65 %	0,80 %	2,34 %	1,98 %	
Anzahl der verwendeten Instrumente		10	11	10	10	31	
Anzahl der verwendeten Module		40	41	41	40	121	

[1] Tests insgesamt = 21, 2 – Kein Ergebnis, 1 – Ungültig
[2] Tests insgesamt = 5, 1 negatives an Stelle eines positiven Ergebnisses
[3] Tests insgesamt = 5, 1 – Ungültig
[4] Tests insgesamt = 6, 1 – Kein Ergebnis

Quellenangaben

1. Viral ("Aseptic") Meningitis. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases: Respiratory and Enteric Viruses Branch. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm (Abruf 11. April 2006).

2. Rotbart HA. Viral meningitis. Semin Neurol. 2000; 20(3): 277-92.

3. Romero JR, Rotbart HA. Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003: 1427-1438.

4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, et al. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 2002; 21: 283-6.

5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY und McKinney RW (eds) (1993). HHS Publikationsnummer (CDC) 93-8395.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (siehe letzte Ausgabe).

7. Wright HT, McAllister RM, Ward R. "Mixed" Meningitis: Report of a Case with Isolation of Haemophilus Influenzae Type B and ECHO Virus Type 9 from the Cerebrospinal Fluid. New England Journal of Medicine. 1962; 267: 142-144.

8. Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacteria and viral pathogens from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal. 1988; 7: 552-556.

9. Dronkert ML, Ketel AG, de Groot R. Simultaneous occurrence of group B Streptococcus and echovirus 20. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 915.

Unterstützung

Wenn Sie Unterstützung benötigen, wenden Sie sich mithilfe der folgenden Kontaktdaten an Cepheid. Geben Sie bei Ihrem Anruf bzw. in Ihrer E-Mail auf jeden Fall die Seriennummer des Instruments und die Chargen-ID des Reagenz an.

Nordamerika

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +1.888.838.3222

E-Mail: techsupport@cepheid.com

Sie können den technischen Support von Cepheid montags bis freitags von 6:00 bis to 17:00 Uhr pazifischer Zeit erreichen.

EU

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +33.563.82.53.19

E-Mail: techsupport@cepheideurope.fr

Andere Standorte

Wenden Sie sich an Ihre lokale Cepheid-Niederlassung.

Symboltabelle

Symbol	Bedeutung
REF	Katalog-Nr.
IVD	Medizinisches Gerät zur In-vitro-Diagnostik
	Nicht wiederverwenden
	Vorsicht, beiliegendes Dokument konsultieren
	Hersteller
	Reicht für <n> Tests
	Verfallsdatum
CONTROL	Kontrolle
EC REP	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft
+2 °C +28	Temperaturbegrenzung
	Biologische Gefahr

Hersteller

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Telefon: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Autorisierte Vertretung

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-Mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Español

Dispositivo sanitario para diagnóstico in vitro

Denominación común

Xpert® EV

Nombre común o de uso frecuente

Xpert EV Assay

Uso previsto

El ensayo Xpert EV de Cepheid® es una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (TI-RCP) que utiliza el sistema GeneXpert® Dx para la detección cualitativa presunta de ARN de enterovirus (EV) en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de individuos con signos y síntomas de meningitis. Esta prueba, junto con otros resultados de laboratorio e información clínica, puede usarse como una ayuda en el diagnóstico en laboratorio de una infección por enterovirus en pacientes en los que exista sospecha clínica de meningitis o meningoencefalitis. Las características de rendimiento del ensayo no han sido establecidas para pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos.

PRECAUCIÓN: Los resultados del ensayo Xpert EV deben utilizarse únicamente como complemento de las observaciones clínicas y demás información a disposición del médico. Un resultado positivo en el ensayo Xpert EV no descarta otra causas de meningitis, incluyendo bacterias, micobacterias, otros virus (por ejemplo, virus de la familia del herpes, arbovirus, virus de paperas, etc.) y hongos.

Resumen y explicación

El ensayo Xpert EV de Cepheid® es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (TI-RCP) que se utiliza para detectar ARN de enterovirus en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Los enterovirus se clasifican taxonómicamente como aquellos virus incluidos en las especies de poliovirus, coxsackievirus, echovirus y enterovirus.[3] Los enterovirus causan una amplia variedad de infecciones y son los virus que se contagian más fácilmente por contacto con secreciones respiratorias de una persona infectada.[1] Los síntomas más comunes son fiebre, fuerte dolor de cabeza, rigidez en el cuello, luces brillantes que dañan los ojos, somnolencia o confusión y náuseas y vómitos. En los niños, los síntomas incluyen fiebre, inquietud o irritabilidad, dificultad para permanecer despierto o pérdida de apetito.[1] Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas o provocan pequeños cuadros febriles, a menudo requieren hospitalización, especialmente en bebés y niños. Cerca del 90% de los casos de meningitis viral están causados por enterovirus;[2] y los enterovirus son la causa más común de meningitis en los Estados Unidos, con un número estimado de hospitalizaciones que oscila entre 30.000 y 50.000 al año.[3] La meningitis por enterovirus suele desaparecer por sí sola en 7 – 10 días. Sin embargo, las meningitis con causas no virales, entre las que se incluye la meningitis bacteriana, pueden ser graves y pueden producir discapacidad o muerte si no se tratan rápidamente, por lo que la meningitis debe considerarse como una enfermedad grave.[1]

Una prueba de detección de enterovirus, junto con la observación clínica y demás información clínica, puede ayudar a los médicos a identificar a aquellos pacientes con meningitis por enterovirus para facilitar el tratamiento de los pacientes.[4]

Principio del procedimiento

El sistema GeneXpert Dx® automatiza e integra la purificación de muestras, la multiplicación del ácido nucleico y la detección de la secuencia diana en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de RCP y TI-RCP en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y un software cargado previamente para la realización de pruebas con las muestras recogidas y la visualización de los resultados. Este sistema requiere el uso de cartuchos GeneXpert® desechables de un solo uso, que contienen los reactivos de amplificación y en el que tiene lugar el proceso completo de RCP. Dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada entre muestras. Si desea obtener una descripción detallada del sistema, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx*.

El ensayo Xpert EV ha sido diseñado para detectar ARN de enterovirus (EV) (región 5' no transcrita del genoma del enterovirus [UTR] entre los nucleótidos 452 y 596) en muestras de LCR. El ensayo incluye los reactivos, iniciadores y sondas necesarios para la detección simultánea de ácido nucleico del EV objetivo y del control de procesamiento de la muestra/control interno (SPC/IC). El ensayo incluye el SPC/IC para que poder verificar el adecuado procesamiento del virus objetivo y realiza el seguimiento de la presencia de inhibidores en el ensayo TI-RCP para evitar un resultado falso negativo. (Tenga en cuenta que, en el software del sistema GeneXpert® Dx, el nombre empleado para el SPC/IC es CIC.) El ensayo también incluye un control de comprobación de sonda que permite comprobar la rehidratación de los reactivos, la integridad de la sonda y el llenado del tubo de reacción en el cartucho.

Para realizar una prueba, la muestra de LCR y los cuatro reactivos se transfieren a los compartimentos específicos del cartucho Xpert EV. El sistema GeneXpert® Dx realiza la preparación de las muestras mediante la lisis del virus y del SPC (ARN de pseudovirus encapsidado), la unión del ARN a la matriz de captura y la dilución del ARN. El ARN se mezcla a continuación con los reactivos secos de TI y se transfiere al tubo de reacción, donde se va a realizar la preparación de ADNc. El ADNc se mezcla entonces con los reactivos secos de RCP y se transfiere al tubo de reacción para la realización de la RCP y la detección en tiempo real. Los iniciadores y la sonda de EV amplifican y detectan una región consenso de la región 5' no transcrita (UTR) del enterovirus. La prueba dura aproximadamente 2,5 horas.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

El kit del ensayo Xpert EV (GXEV-100N-10) contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras. El kit incluye lo siguiente:

Cartuchos Xpert EV	**10 cartuchos/kit**
Perla 1 (liofilizada)	**1 por cartucho**
• Transcriptasa inversa	
• Inhibidor de ARNasa	
• dNTPs	
• BSA (albúmina sérica bovina)	
Perla 2 (liofilizada)	**1 por cartucho**
• Oligonucleótidos iniciadores inversos	
• BSA (albúmina sérica bovina)	
Perla 3 (liofilizada)	**1 por cartucho**
• ADN polimerasa	
• dNTPs	
• BSA (albúmina sérica bovina)	
Perla 4 (liofilizada)	**1 por cartucho**
• Iniciadores oligonucleótidos directos	
• Sondas de oligonucleótidos marcados fluorescentemente	
• BSA (albúmina sérica bovina)	
Perla 5 (liofilizada)	**1 por cartucho**
• Control de procesamiento de muestra (ARN de pseudovirus encapsidado CIC)	
• BSA (albúmina sérica bovina)	
Reactivo de unión (1)	**10 × 1 mL**
• Etanol	
• Agua	
Reactivo de lavado (2)	**10 × 3,2 mL**
• Clorhidrato de cisteamina	
• EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	
• KCl	
• MTG (monotioglicerol)	
• PEG (polietilenglicol)	
• Tris, pH 7,0	
• Tween-20	
• Agua	

Reactivo de dilución (3) **10 × 2,0 mL**

- Sulfato amónico
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Tris, pH 7,0
- Agua

Reactivo de lisis (4) **10 × 300 µL**

- N-acetil-L-cisteína
- Tiocianato de guanidina
- N-lauroilsarcosina
- Citrato sódico, pH 6,8
- Agua

Notas:

- Se pueden solicitar las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) correspondientes a todos los reactivos suministrados con este equipo al servicio técnico de Cepheid.
- La seroalbúmina bovina (BSA) contenida en este producto se ha fabricado exclusivamente a partir de plasma bovino recogido en los Estados Unidos. También la BSA se fabrica en Estados Unidos. No se alimentó a los animales con proteínas de rumiante ni otras proteínas de origen animal; los animales fueron sometidos a pruebas ante y post mortem. Durante el procesamiento no se produjo mezcla alguna del material con otras materias de origen animal.

Almacenamiento y manipulación

- Guarde los cartuchos Xpert EV y los reactivos a 2 – 28 °C.
- No abra un cartucho hasta que esté preparado para realizar la prueba.
- Use el cartucho y los reactivos en los 30 minutos siguientes a la apertura del envase.
- No utilice cartuchos o reactivos después de la fecha de caducidad expirada.
- No utilice los reactivos si observa que están turbios o se han decolorado.

Material necesario no suministrado

- Sistema GeneXpert® Dx (el número de referencia varía según la configuración): Instrumento GeneXpert®, ordenador, escáner de códigos de barras y Manual del operador
- Impresora (consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx* para conocer las indicaciones sobre compatibilidad)
- CD del ensayo Xpert EV (Ref. 950-0125)
- Pipeta de 200 µL
- Puntas de pipeta estériles de 200 µL

Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- El reactivo de lisis contiene tiocianato de guanidina, que puede formar compuestos altamente reactivos si se combina con lejía. Si el líquido que contiene este reactivo se derrama, debe limpiar el área con detergente de laboratorio y agua.
- Trate todas las muestras biológicas, incluyendo los cartuchos, como posibles agentes de transmisión de infecciones. Dado que es imposible determinar los posibles focos de infección, todas las muestras de origen humano se deben tratar teniendo en cuenta las precauciones universales. Las directrices para la manipulación de muestras se pueden consultar en U.S. Center for Disease Control and Prevention[5] (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU.) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Control de Estándares de Laboratorio).[6]
- Deseche todos los materiales peligrosos o biológicamente contaminados de acuerdo con las normas de su institución. Deseche todos los materiales de forma segura y aceptable, y de conformidad con todos los requisitos locales, estatales y federales.

Recogida y transporte de muestras

Recoja el LCR en un recipiente estéril y llévelo al laboratorio de acuerdo con el procedimiento estándar de funcionamiento de su centro. Mantenga las muestras a 2 – 8 °C hasta que vaya a realizar la prueba o manténgalas congeladas si la prueba no va a realizarse en las

72 horas siguientes a la recogida. No congele y descongele las muestras más de dos veces. No se recomienda la centrifugación de la muestra.

Procedimiento

Precauciones

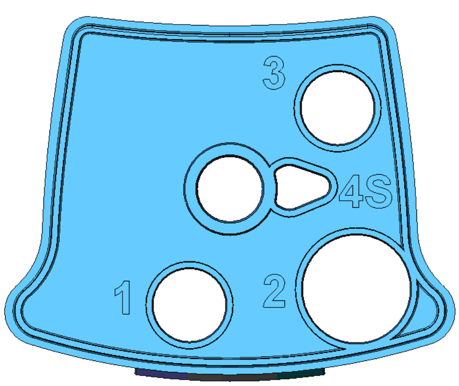
- No sustituya los reactivos Xpert EV por ningún otro reactivo.
- No abra la tapa del cartucho Xpert EV salvo para añadir la muestra y los reactivos.
- No cargue un cartucho Xpert EV que se haya caído o agitado después de introducir la muestra y los reactivos.
- No cargue un cartucho con un tubo de reacción dañado.
- No abra los cartuchos Xpert EV usados.
- No reutilice los cartuchos Xpert EV.
- No congele y descongele las muestras más de dos veces.
- No utilice muestras que hayan sido centrifugadas.

Preparación del cartucho

Para añadir la muestra y los reactivos al cartucho (Figura 1):

1. Saque un cartucho y los reactivos del envase.
2. Abra la ampolla del reactivo de unión (1) girando y rompiendo el tapón.
3. Introduzca el extremo de la ampolla de reactivo de unión (1) en el compartimento 1 del cartucho y sacuda la ampolla hasta que se haya vaciado todo su contenido.
4. Abra la ampolla del reactivo de lavado (2) girando y rompiendo el tapón.
5. Introduzca el extremo de la ampolla de reactivo de lavado (2) en el compartimento 2 del cartucho y sacuda la ampolla hasta que se haya vaciado todo su contenido.
6. Abra la ampolla del reactivo de dilución (3) girando y rompiendo el tapón.
7. Introduzca el extremo de la ampolla de reactivo de dilución (3) en el compartimento 3 del cartucho y sacuda la ampolla hasta que se haya vaciado todo su contenido.
8. Usando la pipeta de 200 µL, añada 140 µL del reactivo de lisis (4) en el compartimento 4S del cartucho. Deseche el vial del reactivo de lisis (4).
9. Usando la pipeta de 200 µL, añada 140 µL de la muestra en el compartimento 4S del cartucho. Para evitar que se formen grandes burbujas de aire, asegúrese de mantener la punta de la pipeta en la parte superior del compartimento y de dispensar la muestra lentamente.
10. Cierre la tapa del cartucho.

Importante: Asegúrese de cargar el cartucho en el instrumento GeneXpert® Dx e inicie la prueba en los 30 minutos siguientes a la adición de los reactivos.



1 = Reactivo de unión
2 = Reactivo de lavado
3 = Reactivo de dilución
4S = Reactivo de lisis y Muestra

Figura 1. Cartucho Xpert EV (vista superior).

Inicio de la prueba

Importante: Antes de iniciar la prueba, asegúrese de que ha importado la definición del ensayo Xpert EV al software (consulte las instrucciones suministradas con el CD de ensayos). Si no tiene el CD del ensayo Xpert EV, póngase en contacto con el servicio técnico de Cepheid.

En esta sección se incluyen los pasos básicos para realizar la prueba. Si desea obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx.*

1. Encienda el equipo y, a continuación, el instrumento GeneXpert® Dx.
2. En el escritorio de Windows®, haga doble clic en el icono de acceso directo a GeneXpert® Dx.
3. Inicie una sesión en el software del sistema GeneXpert® Dx con su nombre de usuario y contraseña.
4. En la ventana del sistema GeneXpert® Dx, haga clic en **Create Test (Crear prueba).** Aparece el cuadro de diálogo Scan Cartridge Barcode (Escanear código de barras de cartucho).
5. Escanee el código de barras del cartucho Xpert EV. Aparece la ventana **Create Test (Crear prueba)**. Utilizando la información del código de barras, el software rellenará automáticamente los siguientes cuadros: **Select Assay (Seleccionar ensayo)**, **Reagent Lot ID (Id. de lote de reactivos)**, **Cartridge S/N (N.º de serie del cartucho)** y **Expiration Date (Fecha de caducidad)**.
6. En el cuadro **Sample ID (Id. de muestra)**, escanee o escriba el Id. de muestra. Asegúrese de escribir el Id. de muestra correcto. El Id. de muestra está asociado a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **View Results (Ver resultados)** y en todos los informes.
7. Haga clic en **Start Test (Iniciar prueba).** En el cuadro de diálogo que aparece, escriba su contraseña.
8. Abra la puerta del módulo del instrumento mientras la luz esté parpadeando en verde y cargue el cartucho.
9. Cierre la puerta del módulo. Asegúrese de que la luz verde permanece encendida.
10. Una vez finalizada la prueba, la luz del módulo del instrumento se apaga.
11. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta para abrir la puerta del módulo y retirar el cartucho.
12. Siga las normas de seguridad del laboratorio para desechar el cartucho.

Visualización e impresión de los resultados

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx.*

CONTROL Control de calidad

El necesario control de calidad debe realizarse conforme a la reglamentación local, estatal y/o federal o a los requisitos de acreditación, así como conforme a los procedimientos de control de calidad estándares de su laboratorio.

Cada prueba incluye dos controles internos para validar el ensayo: Control de procesamiento de muestra/control interno y comprobación de sonda. Las muestras sometidas a prueba se controlan de acuerdo con los siguientes procedimientos:

- **Sample-processing control/internal control (Control de procesamiento de muestra/control interno) (SPC/IC):** El SPC/IC es un ARN de pseudovirus encapsidado en forma de perlas secas y está incluido en cada cartucho. El SPC/IC verifica la adecuada lisis del EV objetivo y el adecuado procesamiento de la muestra, y detecta cualquier tipo de interferencia en el ensayo.

  Se mezcla con la muestra para controlar el adecuado procesamiento de la misma y la integridad del ensayo TI-RCP. El SPC/IC se considera aprobado si cumple los criterios de aceptación validados. Tenga en cuenta que, en el software del sistema GeneXpert® Dx, el nombre empleado para el SPC/IC es CIC.

- **Probe check (Comprobación de sonda):** Antes de iniciar la reacción RCP, el sistema realiza una comprobación de la sonda en el EV objetivo y en el SPC/IC para verificar la rehidratación de las perlas de reactivo y el llenado del tubo de reacción. Cada una de las comprobaciones de sonda se considera aprobada si cumple los criterios de aceptación validados.
- **External Controls (Controles externos):** Los controles externos deben utilizarse para formación, prueba de evaluación y CC externo del sistema GeneXpert® Dx. Los controles externos deben emplearse de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, estatales y federales, según corresponda. Los controles externos pueden prepararse diluyendo la cepa Coxsackievirus A9 Bozek o cepa tipo Coxsackievirus A6 C.G. (Gdula) con LCR de paciente negativo o con LCR sintético negativo (por ejemplo, ref. HSP-515 deSeraCare Life Sciences Inc.) para aproximadamente 10 – 1000 TCID50/mL, que proporciona un rango Ct de EV de 32 – 35 para elensayo Xpert EV.

Interpretación de los resultados

Los resultados se muestran en el sistema GeneXpert® Dx, en la ventana View Results (Ver resultados). En esta sección se describen los diferentes resultados posibles.

Nota: En la ventana **View Results (Ver resultados)** del sistema GeneXpert® Dx , el SPC/IC se muestra como CIC en la columna **Analyte Name (Nombre de analito)**.

PRECAUCIÓN: Los resultados del ensayo Xpert EV deben utilizarse únicamente como complemento de la observación clínica y demás información a disposición del médico. Un resultado positivo en el ensayo Xpert EV no descarta otra causas de meningitis, incluyendo bacterias, micobacterias, otros virus (por ejemplo, virus de la familia del herpes, arbovirus, virus de paperas, etc.) y hongos.

POSITIVE (POSITIVO) (Figura 2)

Se ha detectado el ácido nucleico del EV objetivo (Sistema GeneXpert® Dx : Ventana **View Results (Ver resultados)**. Observe que el SPC/IC se muestra como CIC):

- EV: POS
- CIC (SPC/IC): NA (Cuando el título de EV es elevado, se puede suprimir el TI-RCP para el SPC.)
- Comprobación de sonda: APROBADO
- **Un resultado positivo en el ensayo Xpert EV no descarta otra causas de meningitis, incluyendo bacterias, micobacterias, otros virus (por ejemplo, virus de la familia del herpes, arbovirus, virus de paperas, etc.) y hongos.**

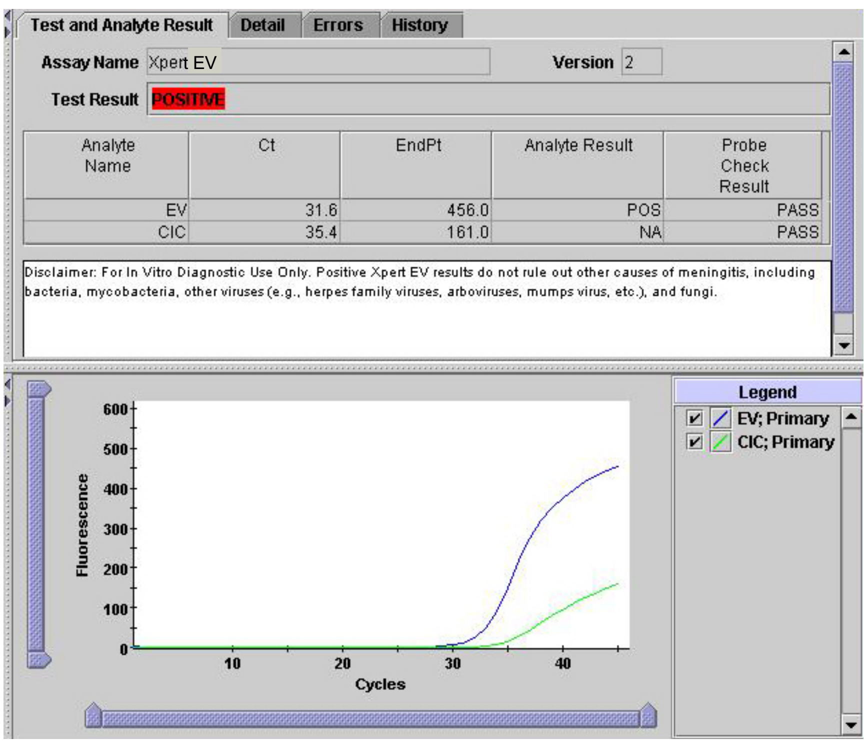


Figura 2. Resultado positivo (Sistema GeneXpert® Dx: ventana **View Results (Ver resultados).** Observe que el SPC/IC se muestra como CIC).

NEGATIVE (NEGATIVO) (Figura 3)

No se ha detectado el ácido nucleico del EV objetivo, pero SPC satisface los criterios de aceptación (Sistema GeneXpert® Dx: Ventana **View Results (Ver resultados)** Observe que

el SPC/IC se muestra como CIC):

- EV: NEG
- CIC (SPC/IC): PASS
- Probe Check: PASS
- **Un resultado negativo en el ensayo Xpert EV no descarta los enterovirus como causa de la meningitis, pero no se ha podido detectar el enterovirus.**

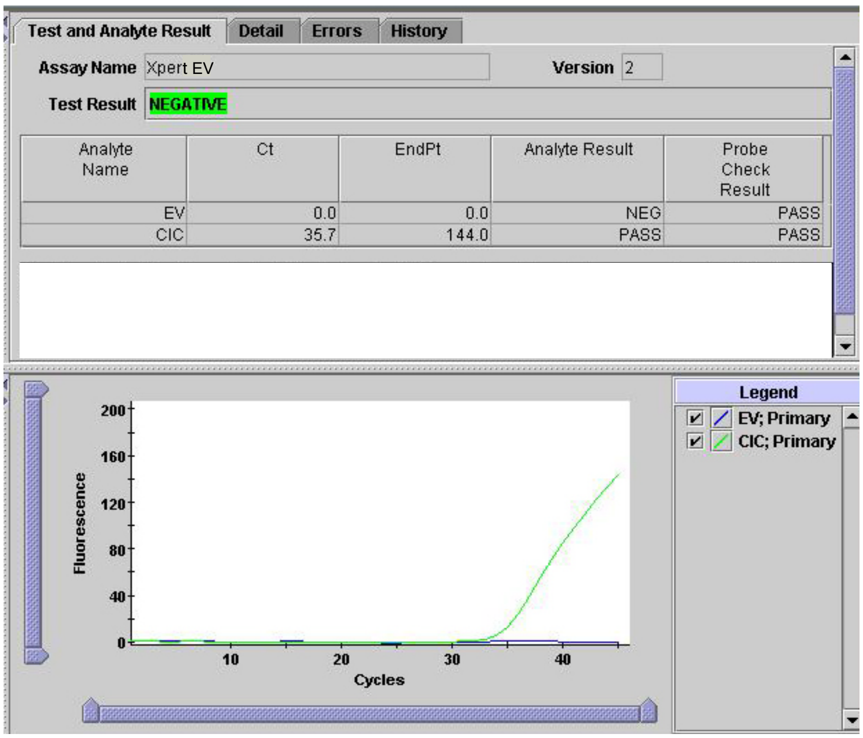


Figura 3. Resultado negativo (Sistema GeneXpert® Dx: ventana **View Results (Ver resultados).** Observe que el SPC/IC se muestra como CIC).

INVALID (NO VÁLIDO) (Figura 4)

No se puede determinar la presencia o ausencia de ácido nucleico del EV objetivo, repita la prueba con más muestra. El SPC/IC no cumple los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa (Sistema GeneXpert® Dx : Ventana **View Results (Ver resultados)**. Observe que el SPC/IC se muestra como CIC):

- EV: INVALID
- CIC (SPC/IC): FAIL
- Probe Check: PASS

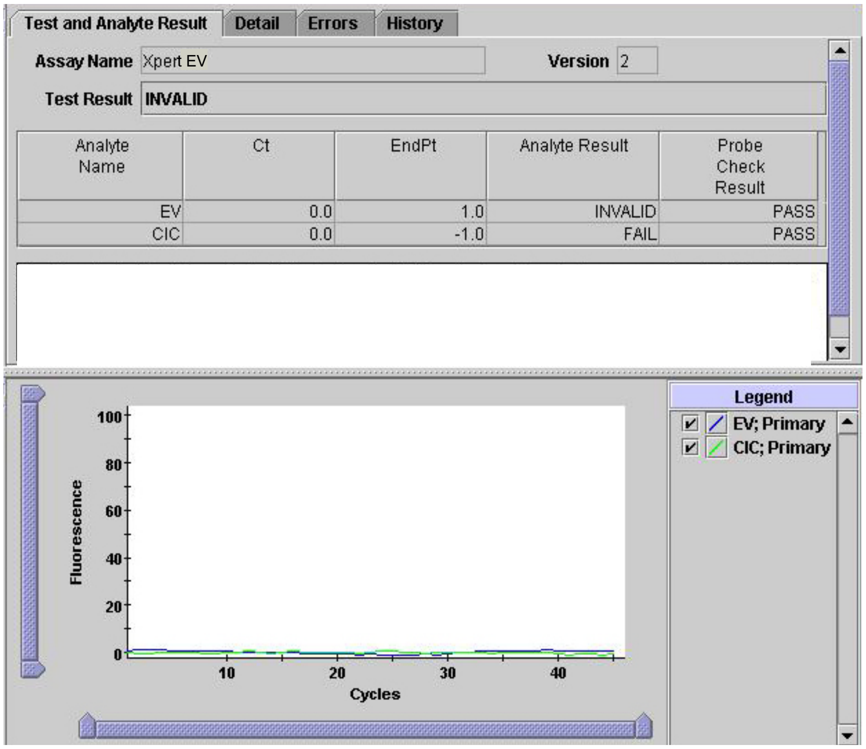


Figura 4. Resultado no válido (Sistema GeneXpert® Dx: ventana **View Results (Ver resultados).** Observe que el SPC/IC se muestra como CIC).

ERROR

No se puede determinar la presencia o ausencia de ácido nucleico del EV objetivo, repita la prueba con más muestra. El control de Comprobación de sonda ha fallado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad de la sonda o se ha anulado un ensayo:

- EV: NO RESULT
- CIC (SPC/IC): NO RESULT
- Probe Check: FAIL

NO RESULT (SIN RESULTADO)

No se puede determinar la presencia o ausencia de ácido nucleico del EV objetivo, repita la prueba con más muestra. No se han recogido suficientes datos para generar un resultado de la prueba (por ejemplo, si el operador ha detenido una prueba que estaba en progreso):

- EV: NO RESULT
- CIC (SPC/IC): NO RESULT
- Probe Check: NA

Motivos para repetir el ensayo

Repita el ensayo con muestra nueva si se generan los siguientes resultados:

- Un resultado INVALID indica que los controles SPC/IC han fallado. La muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa.

- Un resultado ERROR indica que el control de Comprobación de la sonda ha fallado y que el ensayo ha sido anulado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad del reactivo o se han superado los límites de presión máxima.
- Un NO RESULT indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador ha detenido una prueba que estaba en progreso.

Limitaciones

- Los resultados del ensayo Xpert EV se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico. Un resultado positivo en el ensayo Xpert EV no descarta la presencia de otro patógeno, como bacterias, en el líquido cefalorraquídeo. Al igual que en cualquier ensayo molecular, siempre existe la posibilidad de falsos positivos. En la literatura se han descrito casos raros de mezclas simultáneas de meningitis viral y bacteriana.[7, 8, 9]
- El rendimiento del ensayo Xpert EV se ha validado mediante los procedimientos suministrados con estas instrucciones y únicamente con el sistema GeneXpert® Dx de Cepheid. Estos procedimientos no deben modificarse, ya que podrían alterar el rendimiento de la prueba.
- El ensayo Xpert EV está diseñado únicamente para la detección de enterovirus. Un resultado negativo en esta prueba no descarta la presencia de enterovirus. Esta prueba no excluye la posibilidad de una meningitis inducida por Herpes o de una meningitis micótica; para descartar estas infecciones, es necesario llevar a cabo pruebas adicionales.

PRECAUCIÓN: **Al igual que sucede con otros procedimientos diagnósticos, los resultados obtenidos en el ensayo Xpert EV deben utilizarse únicamente como complemento de la observación clínica y demás información a disposición del médico. Un resultado positivo en el ensayo Xpert EV no descarta otra causas de meningitis, incluyendo bacterias, micobacterias, otros virus (por ejemplo, virus de la familia del herpes, arbovirus, virus de paperas, etc.) y hongos.**

Sustancias interferentes

Se han llevado a cabo estudios con sustancias potencialmente interferentes presentes en el líquido cefalorraquídeo. Las sustancias probadas han sido leucocitos, proteína, sangre total y hemoglobina. El contenido de leucocitos fue comprobado usando leucocitos (células de leucemia humana K562) añadidos al LCR.

Para detectar la posible interferencia de las punciones hemáticas, se comprobaron muestras de LCR humano contaminadas con varios niveles (hasta 125.000 glóbulos rojos/mm^3) de sangre.

Los rangos de concentración y las sustancias interferentes encontradas en el LCR normal se indican en la Tabla 1a. También se muestran los rangos potenciales encontrados en el LCR durante la meningitis. Cada sustancia fue añadida a niveles que podrían encontrarse en pacientes normales o con meningitis.

Todas las pruebas se realizaron con LCR con enterovirus de serotipo CVA9 añadido a 80 $TCID_{50}$/mL (~3x LOD).

Tabla 1a. Muestras de sustancias endógenas potencialmente interferentes comprobadas en Xpert EV.

Sustancia	Rango de concentración encontrado en LCR normal	Rango de concentración potencial de LCR (durante la meningitis)	Muestra probada con Xpert EV	Concentraciones probadas
Leucocitos	0 – 5 células/mm^3	5 – 5000 células/mm^3	células K562	Células/mm^3: 0; 3,57; 35,7; 357; 7140
Proteínas de LCR	13 – 40 mg/dL	15 – 217 mg/dL	BSA: IgG (relación 1:1)	Concentración de proteína mg/dL 0; 30; 300; 1.071
Sangre	Ninguna	No aplicable	LCR humano de punción hemática 14	0% a aproximadamente 2,5% v/v de sangre
Hemoglobina	12 – 18 g/dL glóbulos rojos	No aplicable excepto en punciones hemáticas	Hemoglobina (polvo ferroso) añadida al LCR	HgB g/dL 0; 0,36; 0,71; 2,14; 3,6 [Representa aproximadamente v/v de sangre en LCR, respectivamente: 0%; 2,5%; 5%; 15%; 25%]

Como se indica en Tabla 1b, se obtuvieron resultados positivos para enterovirus incluso cuando se introdujo en el ensayo el nivel más elevado de sustancia potencialmente interferente.

Tabla 1b. Resultados del estudio con sustancias endógenas potencialmente interferentes comprobadas en Xpert EV.

Sustancia interferente	Concentración	C_t de EV
Ninguna (Control n = 8)	No aplicable	36,1
Proteína (n = 4)	1071 mg / dL	38,2
Glóbulos rojos (n = 4)	7.140 células/mm^3	37,2
Punción hemática, Muestra 1	2,5% v/v de sangre	35,9
Punción hemática, Muestra 2	2,5% v/v de sangre	35,0
Punción hemática, Muestra 3	2,5% v/v de sangre	35,3
Hemoglobina (n = 4)	3,6 g / dL	36,9

Características de funcionamiento

Resultados clínicos

Las características de funcionamiento del ensayo Xpert EV se determinaron en un estudio de investigación multicentro realizado en seis instituciones.

Para ser incluido en el ensayo, al paciente se le debía haber realizado una punción lumbar como consecuencia de la aparición de síntomas de meningitis y el médico debía haber solicitado una prueba de EV y/o un cultivo viral. El paciente debía haber tenido un exceso suficiente de líquido cefalorraquídeo (superior o igual a 0,5 mL) y, en caso necesario, debía haber firmado la autorización de consentimiento por escrito. Las muestras de los pacientes fueron excluidas del estudio si el LCR necesario para la prueba de ácidos nucleicos había sido centrifugado o si no se habían realizado el ensayo Xpert EV ni ensayos para la determinación de verdad clínica dentro del mismo ciclo de congelación-descongelación de la muestra. El historial clínico de los pacientes también fue tenido en consideración: signos y síntomas clínicos; días transcurridos desde la aparición de los síntomas; temperatura máxima; historial de contacto; glóbulos rojos, leucocitos y diferencial del LCR; glucosa y proteína total de LCR; cultivo bacteriano y tinción de Gram de LCR; glucosa en sangre; cultivo viral de otras muestras, si se disponía de ellas.

Se consideró que un paciente presentaba meningitis asociada a EV (Diagnóstico clínico) si se cumplían los siguientes criterios: evidencia clínica consistente con la meningitis, resultados de laboratorio para tinción de Gram de LCR, cultivo bacteriano de LCR, glucosa en LCR, relación glucosa en sangre/LCR, concentración de proteína total de LCR, recuento leucocitario de LCR y cualquier detección de un genoma de EV en LCR y/o cultivo positivo de EV en LCR.

Inicialmente, se seleccionaron 475 pacientes para el estudio. Cuarenta y un pacientes no cumplieron los criterios de inclusión en el estudio y fueron eliminados del análisis, dejando así 434 sujetos analizables de los cuales 255 dieron resultados para todas las pruebas descritas anteriormente.

Tabla 2a. Muestras clínicas prospectivas evaluadas con respecto al "Diagnóstico clínico"

Se incluyeron un total de 199 pacientes prospectivos elegibles, 133 pacientes dieron los 6 resultados para la evaluación de la "verdad clínica". Los datos de sensibilidad y especificidad clínica para Xpert EV se muestran en la siguiente tabla.

		Diagnóstico clínico[1]	
		+	-
Xpert EV	+	26	3
	-	1	103
Totales		**27**	**106**

Sensibilidad clínica: 96,3% (26/27); 95% CI 81,0 – 99,9%
Especificidad clínica: 97,2% (103/106); 95% CI 91,9 – 99,4%

Tabla 2b. Muestras clínicas recogidas prospectivamente y evaluadas con respecto al "Diagnóstico clínico".

Se incluyeron un total de 235 pacientes retrospectivos elegibles, 122 pacientes dieron los 6 resultados para la evaluación de la "verdad clínica". Los datos de sensibilidad y especificidad clínica para Xpert EV se muestran en la siguiente tabla.

		Diagnóstico clínico[1]	
		+	-
Xpert EV	+	23	3
	-	0	96
Totales		**23**	**99**

[1] Se consideró que un paciente presentaba meningitis asociada a EV (Diagnóstico clínico) si se cumplían los siguientes criterios: evidencia clínica consistente con la meningitis, resultados de laboratorio para tinción de Gram de LCR, cultivo bacteriano de LCR, glucosa en LCR, relación glucosa en sangre/LCR, concentración de proteína total de LCR, recuento leucocitario de LCR y detección de un genoma de EV en LCR o cultivo positivo de EV en LCR.

Sensibilidad clínica: 100% (23/23); 95% CI 85,2 – 100%
Especificidad clínica: 97,0% (96/99); 95% CI 91,4 – 99,4%

Tabla 2c. Resultados clínicos del ensayo Xpert EV en referencia al "Diagnóstico clínico" por edad.

Las 133 muestras prospectivas y las 122 muestras clínicas recogidas prospectivamente se agruparon por edades. La sensibilidad y especificidad clínica de cada grupo de edad se muestra en la siguiente tabla.

	Muestras clínicas prospectivas		Muestras clínicas recogidas prospectivamente	
Edad	**Sensibilidad clínica**	**Especificidad clínica**	**Sensibilidad clínica**	**Especificidad clínica**
Neonatal (edad inferior a 2 meses)	100,0% (14/14)	96,0% (24/25)	100,0% (4/4)	90,0% (18/20)
Pediátrica (2 meses a 17 años)	92,3% (12/13)	97,2%(69/71)	100,0 (14/14)	98,1% (51/52)
Adulta (mayores de 18 años)	(0/0)	100,0% (10/10)	100,0% (5/5)	100,0% (27/27)
Total	96,3% (26/27)	97,2% (103/106)	100% (23/23)	97,0% (96/99)

Se realizaron cultivos virales en el 73,7% (320/434) de las muestras elegibles; el resto no disponían de suficiente LCR para realizar un cultivo. Las muestras de LCR de 263 sujetos con suficiente exceso de volumen fueron enviadas a un laboratorio central designado para realizar un cultivo viral. Además, los cultivos virales de 114 muestras de pacientes fueron realizados en los centros participantes en el estudio. De estos 114 sujetos, 57 disponían de cultivos virales realizados en los centros del estudio y en el laboratorio central. Cincuenta y seis de los 57 sujetos presentaban resultados concordantes en los cultivos y 1 sujeto presentó discrepancia entre los resultados locales y los centrales.

El laboratorio central usó viales Super E-Mix Shell para el cultivo viral y las células fueron teñidas con anticuerpo de pan-enterovirus. Las células que resultaron positivas para el anticuerpo del pan-enterovirus fueron teñidas posteriormente con anticuerpo inmunofluorescente indirecto para la identificación del enterovirus. Cada centro participante usó su propio procedimiento estándar para el cultivo viral.

Tabla 3a. Muestras clínicas prospectivas evaluadas con respecto al cultivo viral

De las 199 muestras prospectivas elegibles, 131 dieron resultados en el cultivo viral. No hubo resultados discrepantes en el cultivo viral entre los centros participantes y el laboratorio central. Las correspondencias positivas y negativas entre el Xpert EV y el cultivo viral se muestran en la siguiente tabla.

		Cultivo viral	
		+	**-**
Xpert EV	+	8	13
	-	0	110
Totales		8	123

Correspondencia positiva: 100,0% (8/8); 95% CI 63,1 – 100,0%
Correspondencia negativa: 89,4% (110/123) CI 82,65 – 94,3%

Tabla 3b. Muestras clínicas recogidas prospectivamente y evaluadas con respecto al cultivo viral

De las 235 muestras retrospectivas elegibles, 211 dieron resultados en el cultivo viral. Las correspondencias positivas y negativas entre el Xpert EV y el cultivo viral se muestran en la siguiente tabla.

		Cultivo viral	
		+	-
Xpert EV	+	22	35
	-	1	153
Totales		23	188

Correspondencia positiva: 95,7% (22/23); 95% CI 78,1 – 99,9%
Correspondencia negativa: 81,4% (153/188); 95% CI 75,1 – 86,7%

Tabla 4. Valores esperados para Xpert EV en una población con signos y síntomas consistentes con la meningitis

Los 434 pacientes elegibles fueron agrupados por edad y sexo; el número y porcentaje de casos positivos calculados se muestran en la siguiente tabla.

		Resultado del Xpert EV		
Rango de edad (años)	**Sexo**	**n positivo (%)**	**n negativo (%)**	**Total**
< 1	M	34 (29,3)	82 (70,7)	116
	F	26 (28,3)	66 (71,7)	92
1 – 5	M	8 (25,0)	24 (75,0)	32
	F	3 (11,1)	24 (88,9)	27
6 – 10	M	3 (31,4)	24 (68,6)	35
	F	3 (17,6)	14 (82,4)	17
11 – 15	M	8 (33,3)	16 (66,7)	24
	F	3 (15,0)	17 (85,0)	20
16 – 21	M	3 (20,0)	12 (80,0)	15
	F	3 (25,0)	9 (75,0)	12
>21	M	2 (10,0)	18 (90,0)	20
	F	3 (12,5)	21 (87,5)	24
Total		107 (24,7)	327 (75,3)	434

Prueba de serotipo del enterovirus/reactividad analítica

Se probaron un total de 60 serotipos de enterovirus con el ensayo Xpert EV. Se realizaron diluciones de stock viral en réplicas de 3 para cada serotipo al límite de detección (LOD) esperado. Las diluciones se realizaron sobre una muestra agrupada humana negativa para EV. La sensibilidad analítica estimada se muestra en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5. Sensibilidad analítica estimada.

Se probaron 60 serotipos y en la tabla siguiente se muestran los $TCID_{50}$/mL estimados a los que pueden detectarse dichos serotipos.

Especies	Serotipo	$TCID_{50}$/mL estimado
A	Coxsackie A3	5,01
A	Coxsackie A5	12,59
A	Coxsackie A6	12,59
A	Coxsackie A7	3,33
A	Coxsackie A10	2,81
A	Coxsackie A12	19,95
A	Coxsackie A14	0,10
A	Coxsackie A16	0,002
A	EV 71	0,16
B	Coxsackie A9	20,00
B	Coxsackie B1	4,00
B	Coxsackie B2	0,20
B	Coxsackie B3	0,028
B	Coxsackie B4	0,40
B	Coxsackie B5	0,04
B	Coxsackie B6	0,01
B	Echo 1	0,10
B	Echo 2	0,032
B	Echo 3	200,00
B	Echo 4	0,00032
B	Echo 5	0,032
B	Echo 6	200,00
B	Echo 7	2,00
B	Echo 8	0,10
B	Echo 9	2,00
B	Echo 11	40,00
B	Echo 12	1,58
B	Echo 13	0,01
B	Echo 14	0,0005
B	Echo 15	0,0032
B	Echo 16	0,0005
B	Echo 17	0,05
B	Echo 18	0,0002
B	Echo 19	2,51
B	Echo 20	0,032
B	Echo 21	1,00
B	Echo 24	0,02
B	Echo 25	0,50
B	Echo 26	0,032
B	Echo 27	0,00032
B	Echo 29	5,01
B	Echo 30	0,01
B	Echo 31	0,0032
B	Echo 32	0,10
B	Echo 33	0,05
B	EV 69	0,0002
C	Coxsackie A11	0,11
C	Coxsackie A13	13,27
C	Coxsackie A15	0,0032
C	Coxsackie A17	1,58
C	Coxsackie A18	0,02
C	Coxsackie A19	0,03
C	Coxsackie A20	0,002
C	Coxsackie A21	0,03
C	Coxsackie A22	0,02
C	Coxsackie A24	0,10
D	EV 68	199,53
D	EV 70	2,00
Poliovirus	Poliovirus 1	2,00
Poliovirus	Poliovirus 2	0,40
Poliovirus	Poliovirus 3	20,00

Especificidad analítica

Las secuencias del iniciador y de la sonda empleadas en el ensayo Xpert EV no detectan los ácidos nucleicos extraídos de los siguientes organismos conocidos por provocar síntomas similares a los de la meningitis: EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, AdV-2, sarampión, paperas, Parainfluenza 1 – 3, Influenza A, Influenza B, VZV, CMV, estreptococos de grupo B, *Haemophilus influenzae* B, *H. influenzae* no-B, *Escherichia coli, Neisseria meningitides, Citrobacter freundii* y *Citrobacter koseri,* y el ensayo Xpert EV no generó ningún amplicón detectable cuando "los organismos completos" de los patógenos enumerados fueron procesados a través del cartucho Xpert EV. La tabla siguiente presenta los organismos probados y la concentración para cada organismo probado.

Tabla 6. Especificidad analítica para el ensayo Xpert EV.

En la tabla siguiente se muestran la especificidad de los organismos completos en el ensayo Xpert EV, así como las concentraciones de los organismos probados.

Organismo	Nº organismos/prueba
HHV-6	$3{,}1 \times 10^{6}$ partículas
HHV-7	$1{,}4 \times 10^{7}$ partículas
CMV	700 $TCID_{50}$
EBV	140 $TCID_{50}$
HSV-1	$1{,}4 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$
HSV-2	$1{,}4 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$
AdV-2	$1{,}4 \times 10^{12}$ $TCID_{50}$
Sarampión	700 $TCID_{50}$
Paperas	$1{,}4 \times 10^{4}$ $TCID_{50}$
Parainfluenza 1	$1{,}4 \times 10^{3}$ $TCID_{50}$
Parainfluenza 2	7×10^{3} $TCID_{50}$
Parainfluenza 3	$1{,}4 \times 10^{4}$ $TCID_{50}$
Influenza A	$3{,}5 \times 10^{4}$ $TCID_{50}$
Influenza B	$3{,}5 \times 10^{4}$ $TCID_{50}$
VZV	14 $TCID_{50}$
Estreptococo de grupo B	7×10^{6} células
H. influenzae B	7×10^{6} células
H. influenzae no-B	7×10^{5} células
E.coli	7×10^{6} células
N. meningitides	7×10^{6} células
C. freundii	7×10^{6} células
C. koseri	7×10^{6} células

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica, o límite de detección (LOD), se define como la concentración o cantidad mínima de un analito que puede distinguirse, de forma reproducible y mediante análisis de laboratorio, a partir de una muestra negativa con un nivel de confianza del 95%. Las diluciones se realizaron sobre una muestra agrupada humana negativa para EV. Para la determinación de la confianza estadística del LOD se analizaron réplicas de 20, junto con 20 muestras negativas para EV. Las muestras fueron Coxsackievirus A6 (CVA6), Coxsackievirus A9 (CVA9), Coxsackievirus A17 (CVA17), Enterovirus 70 (EV70) y Poliovirus 1 (PV1). No se analizaron en cantidades significativamente estadísticas los 63 serotipos. Dado que los sitios de unión del iniciador y de la sonda se conservan en todos los serotipos y que la longitud del amplicón es la misma para todos los serotipos, cabe esperar que la eficacia de amplificación sea la misma para todos los serotipos. Se seleccionaron los 5 serotipos arriba indicados para representar a cada una de las especies de enterovirus CVA6 (A), CVA9 (B), CVA17 (C), EV70 (D) y PV1 (poliovirus).

Tabla 7. Límite de detección para cinco (5) serotipos.

El LOD de los cinco serotipos, uno para cada especie de enterovirus, se muestran en la tabla siguiente.

Serotipo	Límite de detección ($TCID_{50}$/mL)
CVA9	80,0
EV70	1,3
PV1	4,0
CVA17	1,0
CVA6	33,0

Reproducibilidad

La reproducibilidad fue determinada en un estudio ciego multicentro, utilizando un panel de precisión formado por cuatro muestras. Tres de los centros probaron cada panel tres veces al día durante 10 días de pruebas, obteniéndose un total de 90 resultados por muestra de panel. El panel de precisión estaba formado por una muestra negativa y tres muestras positivas, cada una de ellas con un serotipo de EV específico añadido al LCR sintético en una concentración cercana al límite de detección.

Tabla 8. Resumen de los resultados de reproducibilidad.

En la tabla siguiente se muestran el porcentaje de correspondencia, los valores Ct medios para cada concentración, las desviaciones estándares asociadas, el porcentaje del coeficiente de desviación entre los diferentes días y los diferentes centros para el estudio de reproducibilidad multicentro.

Nº de muestras correctamente clasificadas					Entre días		Entre centros		Total	
Serotipo ($TCID_{50}$/mL)	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Ct medio de EV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV
Negativo	30/30	30/30	30/30							
CVA6 (134)	30/30	30/30	29/29[1]	35,0	0,343	0,98%	0,175	0,50%	1,101	3,15%
CVA9 (320)	30/30	30/30	30/30	34,4	0	0,00%	0	0,00%	0,61	1,77%
CVA17 (3)	30/30	30/30	29/29[1]	33,8	0	0,00%	0	0,00%	0,414	1,22%
Correspondencia total	120/120	120/120	118/118							
% de correspondencia	100,00%	100,00%	100,00%							

[1] Dos muestras no dieron ningún resultado en el GeneXpert®.

Con el fin de llevar al límite aún más el sistema, se llevó a cabo un segundo estudio. Así, se realizó un estudio de reproducibilidad interno durante cuatro días sobre múltiples instrumentos GeneXpert® (31) y módulos ICORE (121). Se añadieron dos subtipos de virus completos representativos (Coxsackievirus CVA9 y Enterovirus EV70) a LCR humano negativo para crear muestras simuladas a 2 x LOD y 4 x LOD. La muestra negativa fue analizada 20 veces, mientras que dos muestras positivas fueron analizadas cinco (5) veces al día en dos concentraciones. Del total de muestras comprobadas, dos muestras fueron definidas como "Inválido" y tres muestras como "Sin resultado" según las definiciones de control del software del instrumento. De los 157 resultados comunicables, 155 se clasificaron correctamente.

Tabla 9. Resumen de los resultados del segundo estudio de reproducibilidad

En la tabla siguiente se muestran el nivel de correspondencia, los valores Ct medios para cada concentración, las desviaciones estándares asociadas y el porcentaje del coeficiente de desviación para cada día.

ID de muestra		Correspondencia total : Resultados de C_t					% de correspondencia total
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Todos los días	
Negativo	Correspondencia total	20/20	18/18[1]	20/20	20/20	78/78	100%
	Media	ND	ND	ND	ND	ND	
	DE	ND	ND	ND	ND	ND	
	% CV	ND	ND	ND	ND	ND	
CA9 2X LOD	Correspondencia total	4/5[2]	5/5	4/5[2]	5/5	18/20	90%
	Media	36,65	36,54	36,53	36,54	36,56	
	DE	0,56	0,46	0,21	0,69	0,48	
	% CV	1,53%	1,26%	0,57%	1,89%	1,31%	
CA9 4X LOD	Correspondencia total	5/5	5/5	5/5	4/4[3]	19/19	100%
	Media	34,98	35,56	35,52	35,03	35,28	
	DE	0,53	0,67	0,7	0,3	0,6	
	% CV	1,52%	1,88%	1,97%	0,86%	1,70%	
EV70 2X LOD	Correspondencia total	5/5	5/5	5/5[4]	5/5	20/20	100%
	Media	37,38	37,3	37,55	36,88	37,2	
	DE	1,78	0,74	2,01	0,81	1,3	
	% CV	4,76%	1,98%	5,35%	2,20%	3,49%	
EV70 4X LOD	Correspondencia total	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100%
	Media	36,50	36,60	36,12	35,94	36,29	
	DE	0,58	0,97	0,29	0,84	0,72	
	% CV	1,59%	2,65%	0,80%	2,34%	1,98%	
Número de instrumentos usados		10	11	10	10	31	
Número de módulos usados		40	41	41	40	121	

[1] Análisis totales = 21, 2 – Sin resultado, 1 – Inválido
[2] Análisis totales = 5, 1 resultado negativo en lugar de positivo
[3] Análisis totales = 5, 1 – Inválido
[4] Análisis totales = 6, 1 – Sin resultado

Bibliografía

1. Viral ("Aseptic") Meningitis. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases: Respiratory and Enteric Viruses Branch. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm (acceso el 11 de abril de 2006).

2. Rotbart HA. Viral meningitis. Semin Neurol. 2000; 20(3): 277-92.

3. Romero JR, Rotbart HA. Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003: 1427-1438.

4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, et al. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 2002; 21: 283-6.

5. Centros para el control y la prevención de enfermedades. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

6. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (anteriormente denominado Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

7. Wright HT, McAllister RM, Ward R. "Mixed" Meningitis: Report of a Case with Isolation of Haemophilus Influenzae Type B and ECHO Virus Type 9 from the Cerebrospinal Fluid. New England Journal of Medicine. 1962; 267: 142-144.

8. Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacteria and viral pathogens from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal. 1988; 7: 552-556.

9. Dronkert ML, Ketel AG, de Groot R. Simultaneous occurrence of group B Streptococcus and echovirus 20. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 915.

Asistencia

Si desea obtener asistencia, puede ponerse en contacto con Cepheid mediante los siguientes datos de contacto. No olvide facilitar el número de serie del instrumento y el Id. del lote de reactivos si realiza una llamada o envía un correo electrónico.

Estados Unidos

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +1.888.838.3222

Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Puede ponerse en contacto con Cepheid por teléfono de lunes a viernes y de 6 a.m. a 5 p.m. (hora del Pacífico).

Unión Europea

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +33.563.82.53.19

Correo electrónico: techsupport@cepheideurope.fr

Otras oficinas

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
REF	Número de referencia
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	No reutilizar
	Precaución, consultar el documento adjunto
	Fabricante
Σ	Contiene suficiente cantidad para <n> pruebas
	Fecha de caducidad
CONTROL	Control
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
+2 °C +28	Límite de temperatura
	Riesgo biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
EE.UU.

Teléfono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Representante autorizado

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Correo electrónico: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Italiano

Dispositivo medico per diagnostica *in vitro*

Nome registrato

Xpert® EV

Nome comune o usuale

Saggio Xpert EV

Uso previsto

Il saggio Cepheid® Xpert EV è una PCR con retrotrascrizione (RT-PCR) che utilizza GeneXpert® Dx System per il rilevamento qualitativo presuntivo dell'RNA di enterovirus (EV) nei campioni di liquido cerebrospinale (LCS) di individui con segni e sintomi della meningite. Questa analisi, contestualmente agli altri risultati di laboratorio e informazioni cliniche, può essere utilizzata come strumento nella diagnosi di laboratorio dell'infezione da enterovirus in pazienti con sospetto clinico di meningite o meningoencefalite. Le caratteristiche sulle prestazioni del saggio non sono state stabilite per i pazienti immunodepressi o immunosoppressi.

ATTENZIONE: I risultati ottenuti con il saggio Xpert EV devono essere utilizzati solo come integrazione alle osservazioni cliniche e alle altre informazioni disponibili al medico. I risultati positivi di Xpert EV non escludono altre cause di meningite, compresi batteri, micobatteri, altri virus (per esempio, virus della famiglia degli herpes, arbovirus, virus della parotite, ecc.) e funghi.

Riepilogo e spiegazione

Il saggio Cepheid® Xpert EV è un saggio in PCR con retrotrascrizione (RT-PCR) utilizzato per rilevare l'RNA di enterovirus nei campioni di liquido cerebrospinale (LCS). Gli enterovirus sono classificati tassonomicamente come virus che includono i poliovirus, i virus coxsackie, gli ecovirus e gli enterovirus.[3] Gli enterovirus causano una vasta gamma di infezioni e sono spesso diffusi attraverso il contatto diretto con le secrezioni respiratorie di una persona infetta.[1] I sintomi comuni sono febbre, mal di testa grave, collo rigido, luci intense che feriscono gli occhi, sonnolenza o confusione, nausea e vomito. Nei neonati, i sintomi includono febbre, nervosismo o irritabilità, difficoltà di risveglio o perdita di appetito.[1] Sebbene la maggior parte delle infezioni siano asintomatiche o causino malattie febbrili minori, portano spesso all'ospedalizzazione, in particolare dei neonati e dei bambini. Circa il 90% dei casi di meningite virale è causato da enterovirus,[2] che sono la causa più comune di meningite negli Stati Uniti, con una stima di 30.000 – 50.000 ospedalizzazioni all'anno.[3] La meningite enterovirale di solito si autorisolve nell'arco di 7 – 10 giorni. Tuttavia, cause non virali della meningite, per esempio la meningite batterica, possono essere gravi e causare invalidità o morte se non trattate tempestivamente, pertanto la meningite deve essere presa seriamente.[1]

Un test per enterovirus, insieme all'osservazione clinica e ad altre informazioni cliniche, può aiutare i medici a identificare i pazienti con meningite enterovirale per facilitare la gestione del paziente.[4]

Principio della procedura

GeneXpert® Dx System consente di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi utilizzando i saggi PCR e RT-PCR real time. Il sistema è composto da uno strumento, un personal computer e dal software già installato per l'esecuzione di analisi su campioni raccolti e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso di cartucce Xpert GeneXpert® monouso, nelle cartucce sono contenuti i reagenti per la PCR e sempre nella cartuccia avviene la reazione di PCR. Poiché le cartucce sono indipendenti, non sussiste alcun rischio di contaminazione crociata tra campioni. Per una descrizione completa del sistema, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert® Dx System*.

Il saggio Xpert EV è progettato per rilevare l'RNA di enterovirus (EV) regione non tradotta [UTR] 5' del genoma di enterovirus tra il nucleotide 452 e 596) nei campioni di liquido cerebrospinale (LCS). Il saggio include reagenti, primer e sonde per il rilevamento simultaneo dell'acido nucleico dall'enterovirus bersaglio e il controllo elaborazione del campione/controllo interno (SPC/IC). Il saggio include l'SPC/IC per verificare che l'elaborazione del virus bersaglio sia adeguata e monitora la presenza di inibitori nel saggio RT-PCR per evitare un risultato falso negativo. (Nel software di GeneXpert® Dx System, CIC è il nome per SPC/IC). Il saggio include anche un controllo sonda per verificare la reidratazione dei reagenti, l'integrità della sonda e il riempimento della provetta di reazione nella cartuccia.

Per eseguire l'analisi, il campione di liquido cerebrospinale e i tre reagenti vengono trasferiti nelle camere designate della cartuccia Xpert EV. GeneXpert® Dx System esegue la preparazione dei campioni lisando il virus e l'SPC (pseudovirus di RNA incapsidato), legando l'RNA alla matrice di cattura ed eluendo l'RNA. L'RNA viene miscelato con i reagenti RT secchi e trasferito nella provetta di reazione per la preparazione del cDNA. Il cDNA viene, quindi, miscelato con i reagenti PCR secchi e trasferito nella provetta di reazione per la PCR in tempo reale e il rilevamento. I primer EV e la sonda amplificano e rilevano una regione di consenso della regione non tradotta (UTR) 5' dell'enterovirus. Per l'esecuzione dell'analisi sono necessarie circa 2 ore e mezzo.

Reagenti e strumenti

Σ Materiale fornito

Il kit del saggio Xpert EV (GXEV-100N-10) contiene reagenti sufficienti per elaborare 10 campioni. Il kit contiene il seguente materiale:

Cartucce Xpert EV	**10 cartucce/kit**
Microsfera 1 (congelata-disidratata)	**1 per cartuccia**
• Transcrittasi inversa	
• Inibitore RNase	
• dNTP	
• BSA (sieroalbumina bovina)	
Microsfera 2 (congelata-disidratata)	**1 per cartuccia**
• Primer di oligonucleotidi inversi	
• BSA (sieroalbumina bovina)	
Microsfera 3 (congelata-disidratata)	**1 per cartuccia**
• DNA polimerasi	
• dNTP	
• BSA (sieroalbumina bovina)	
Microsfera 4 (congelata-disidratata)	**1 per cartuccia**
• Primer di oligonucleotidi diretti	
• Sonde di oligonucleotidi marcate con fluorocromi	
• BSA (sieroalbumina bovina)	
Microsfera 5 (congelata-disidratata)	**1 per cartuccia**
• Controllo elaborazione del campione (pseudovirus di RNA CIC incapsidato)	
• BSA (sieroalbumina bovina)	
Reagente legante (1)	**10 × 1 mL**
• Etanolo	
• Acqua	
Reagente di lavaggio (2)	**10 × 3,2 mL**
• Cisteamina HCl	
• EDTA (acido etilendiamminotetracetico)	
• KCl	
• MTG (monotioglicerolo)	
• PEG (polietilenglicole)	
• Tris, pH 7,0	
• Tween-20	
• Acqua	

Reagente di eluizione (3)	**10 × 2,0 mL**

- Solfato di ammonio
- EDTA (acido etilendiamminotetracetico)
- Tris, pH 7,0
- Acqua

Reagente di lisi (4)	**10 × 300 µL**

- N-acetil-L-cisteina
- Guanidina tiocianato
- N-lauroilsarcosina
- Citrato di sodio, pH 6,8
- Acqua

Note:

- Le schede dei dati sulla sicurezza dei materiali (MSDS, Material Safety Data Sheet) per tutti i reagenti forniti in questo saggio sono disponibili su richiesta all'Assistenza tecnica Cepheid.
- La sieroalbumina bovina (BSA) di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Anche la produzione della BSA viene eseguita negli Stati Uniti. Gli animali non sono stati nutriti con proteine bovine o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante mortem e post mortem. Durante l'elaborazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce Xpert EV e i reagenti a 2 – 28° C.
- Non aprire una cartuccia finché non si è pronti per eseguire l'analisi.
- Utilizzare la cartuccia e i reagenti entro 30 minuti dall'apertura della confezione.
- Non utilizzare reagenti o cartucce oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare reagenti diventati torbidi o scoloriti.

Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert® Dx System (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert®, computer, scanner dei codici a barre e manuale dell'operatore
- Stampante (per le linee guida sulla compatibilità, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert® Dx System*)
- CD del saggio Xpert EV (numero di parte 950-0125)
- Pipetta da 200 µL
- Puntali per pipette sterili da 200 µL

Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il reagente di lisi contiene guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi se combinata con candeggina. Se il liquido che contiene questo reagente viene versato, pulire l'area con acqua e detergente da laboratorio.
- Trattare tutti i campioni biologici, incluse le cartucce, come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Poiché è spesso impossibile sapere quale campione potrebbe essere infettivo, tutti i campioni di derivazione umana devono essere trattati adottando le precauzioni universali. Le linee guida per la manipolazione dei campioni sono disponibili presso gli U.S. Center for Disease Control and Prevention [5] e il Clinical and Laboratory Standards Institute – in precedenza denominato National Committee for Clinical Laboratory Standards.[6]
- Smaltire tutti i materiali pericolosi o contaminati biologicamente in conformità alle pratiche del proprio istituto. Eliminare tutti i materiali in modo sicuro e accettabile, nonché in conformità a tutti i requisiti locali, regionali e nazionali vigenti.

Raccolta e trasporto dei campioni

Raccogliere il liquido cerebrospinale in un contenitore sterile e trasportarlo al laboratorio secondo la procedura operativa standard in vigore presso l'istituto. Conservare i campioni a 2 – 8° C fino al momento di eseguire l'analisi oppure congelarli se l'analisi non verrà

eseguita entro 72 ore dalla raccolta. Non congelare e scongelare i campioni più di due volte. La centrifugazione del campione non è consigliata.

Procedura

Precauzioni

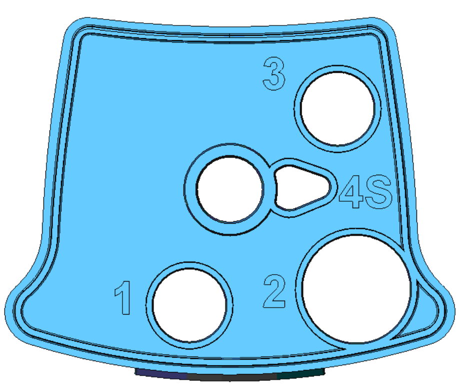
- Non sostituire i reagenti Xpert EV con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert EV eccetto quando si aggiungono il campione e i reagenti.
- Non caricare una cartuccia Xpert EV che è caduta o è stata scossa dopo aver inserito il campione e i reagenti,
- Non caricare una cartuccia con una provetta di reazione danneggiata.
- Non aprire le cartucce Xpert EV usate.
- Non riutilizzare le cartucce Xpert EV usate.
- Non congelare e scongelare i campioni più di due volte.
- Non utilizzare campioni che sono stati centrifugati.

Preparazione della cartuccia

Per aggiungere il campione e i reagenti nella cartuccia (Figura 1):

1. Rimuovere la cartuccia e i reagenti dalla confezione.
2. Aprire la fiala del reagente legante (1) ruotando e spezzando il tappo.
3. Inserire la punta della fiala del reagente legante (1) nella camera 1 della cartuccia e comprimere la fiala finché non è completamente vuota.
4. Aprire la fiala del reagente di lavaggio (2) ruotando e spezzando il tappo.
5. Inserire la punta della fiala del reagente di lavaggio (2) nella camera 2 della cartuccia e comprimere la fiala finché non è completamente vuota.
6. Aprire la fiala del reagente di eluizione (3) ruotando e spezzando il tappo.
7. Inserire la punta della fiala del reagente di eluizione (3) nella camera 3 della cartuccia e comprimere la fiala finché non è completamente vuota.
8. Utilizzando la pipetta da 200 µL, aggiungere 140 µL del reagente di lisi (4) alla camera 4S della cartuccia. Gettare il flacone del reagente di lisi (4).
9. Utilizzando la pipetta da 200 µL, aggiungere 140 µL del campione alla camera 4S della cartuccia. Per impedire la formazione di grandi bolle d'aria, accertarsi di tenere il puntale per pipetta sulla parte superiore della camera e dispensare il campione lentamente.
10. Chiudere il coperchio della cartuccia.

Importante: accertarsi di caricare la cartuccia nello strumento GeneXpert® Dx e avviare l'analisi entro 30 minuti dall'aggiunta dei reagenti.



1 = Reagente legante
2 = Reagente di lavaggio
3 = Reagente di eluizione
4S = Reagente di lisi e campione

Figura 1. Cartuccia Xpert EV (vista superiore).

Avvio dell'analisi

Importante: prima di avviare l'analisi, accertarsi che la definizione del saggio Xpert EV sia importata nel software (vedere le istruzioni fornite nel CD del saggio). Se non si possiede il CD del saggio Xpert EV, contattare l'Assistenza tecnica Cepheid.

Questa sezione elenca i passaggi di base dell'esecuzione dell'analisi. Per istruzioni dettagliate, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert® Dx System*.

1. Accendere il computer, quindi accendere lo strumento GeneXpert® Dx.
2. Sul desktop di Windows® fare doppio clic sull'icona di collegamento GeneXpert® Dx.
3. Connettersi al software di GeneXpert® Dx System con il proprio nome utilizzatore e la password.
4. Nella finestra GeneXpert® Dx System, fare clic su **Create Test** (Crea analisi). Verrà visualizzata la finestra di dialogo Scan Cartridge Barcode (Analizza codice a barre cartuccia).
5. Eseguire la scansione del codice a barre sulla cartuccia Xpert EV. Verrà visualizzata la finestra **Create Test** (Crea analisi). Utilizzando le informazioni del codice a barre, il software completa automaticamente le caselle seguenti: **Select Assay** (Seleziona saggio), **Reagent Lot ID** (ID lotto reagenti), **Cartridge SN** (Cartuccia SN) ed **Expiration Date** (Data di scadenza).
6. Nella casella **Sample ID** (ID campione), eseguire la scansione o digitare l'ID del campione. Accertarsi di digitare correttamente l'ID del campione. L'ID del campione è associato ai risultati dell'analisi ed è mostrato nella finestra **View Results** (Visualizza risultati) e in tutte le relazioni.
7. Fare clic su **Start Test (Avvia analisi);** nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la password.
8. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
9. Chiudere lo sportello del modulo. Assicurarsi che la spia verde sia fissa.
10. Al termine dell'analisi, la spia del modulo dello strumento si spegne.
11. Attendere che il sistema sblocchi il meccanismo di chiusura dello sportello prima di aprire lo sportello del modulo e rimuovere la cartuccia.
12. Attenersi alle linee guida sulla sicurezza del proprio laboratorio per lo smaltimento della cartuccia.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni su come visualizzare e stampare i risultati, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert® Dx System*.

CONTROL Controllo di qualità

I requisiti per il controllo di qualità devono essere in conformità con le normative locali, regionali e/o nazionali o i requisiti di certificazione e le procedure per il controllo di qualità standard del proprio laboratorio.

Ogni analisi include due controlli interni per validare il saggio: controllo elaborazione del campione/controllo interno e controllo sonda. I campioni di analisi sono controllati secondo le procedure seguenti:

- **Sample-processing control/internal control (SPC/IC)** (Controllo elaborazione del campione/controllo interno, SPC/IC): l'SPC/IC è uno pseudovirus di RNA incapsidato sotto forma di una microsfera secca ed è incluso in ogni cartuccia. L'SPC/IC verifica l'adeguatezza della lisi dell'EV bersaglio e dell'elaborazione del campione, nonché rileva l'interferenza del saggio.

  Viene miscelato al campione per controllare l'adeguatezza dell'elaborazione del campione e per monitorare l'integrità del saggio RT-PCR. L'SPC/IC viene accettato se soddisfa i criteri di accettazione validati. Nel software del sistema GeneXpert® Dx, CIC è il nome per SPC/IC.

- **Probe check** (Controllo sonda): prima dell'avvio della reazione PCR, il sistema esegue un controllo della sonda sia sull'EV bersaglio sia sull'SPC/IC per verificare la reidratazione delle microsfere dei reagenti e il riempimento della provetta di reazione. Ogni controllo sonda viene accettato se soddisfa i criteri di accettazione validati.
- **External Controls** (Controlli esterni): i controlli esterni devono essere utilizzati per il training, il test di competenza e il CQ esterno di GeneXpert® Dx System. I controlli esterni devono essere utilizzati in accordo con le organizzazioni di accreditamento locali, regionali e nazionali, se applicabile. I controlli esterni possono essere preparati diluendo il ceppo di virus coxsackie A9 (Bozek) o il ceppo di virus coxsackie A6 C.G. (Gdula) con LCS di paziente di negatività accertata o LCS sintetico (per esempio, SeraCare Life Sciences Inc., numero di catalogo HSP-515) a circa 10 – 1.000 $TCID_{50}$/mL che fornisce un intervallo EV C_t di 32 – 35 per il saggio Xpert EV.

Interpretazione dei risultati

I risultati sono disponibili nella finestra GeneXpert® Dx System – View Results (Visualizza risultati). I risultati possibili sono descritti in questa sezione.

Nota: nella finestra **View Results** (Visualizza risultati) di GeneXpert® Dx System, l'SPC/IC viene visualizzato come CIC nella colonna **Analyte Name** (Nome analita).

ATTENZIONE: i risultati ottenuti con il saggio Xpert EV devono essere utilizzati solo come integrazione all'osservazione clinica e alle altre informazioni disponibili al medico. I risultati positivi di Xpert EV non escludono altre cause di meningite, compresi batteri, micobatteri, altri virus (per esempio, virus della famiglia degli herpes, arbovirus, virus della parotite, ecc.) e funghi.

POSITIVE (POSITIVO) (Figura 2)

L'acido nucleico bersaglio dell'EV viene rilevato (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC è visualizzato come CIC):

- EV: POS
- CIC (SPC/IC): NA (quando il titolo EV è alto, la RT-PCR per SPC potrebbe essere soppressa).
- Probe Check: PASS
- **I risultati positivi di Xpert EV non escludono altre cause di meningite, compresi batteri, micobatteri, altri virus (per esempio, virus della famiglia degli herpes, arbovirus, virus della parotite, ecc.) e funghi.**

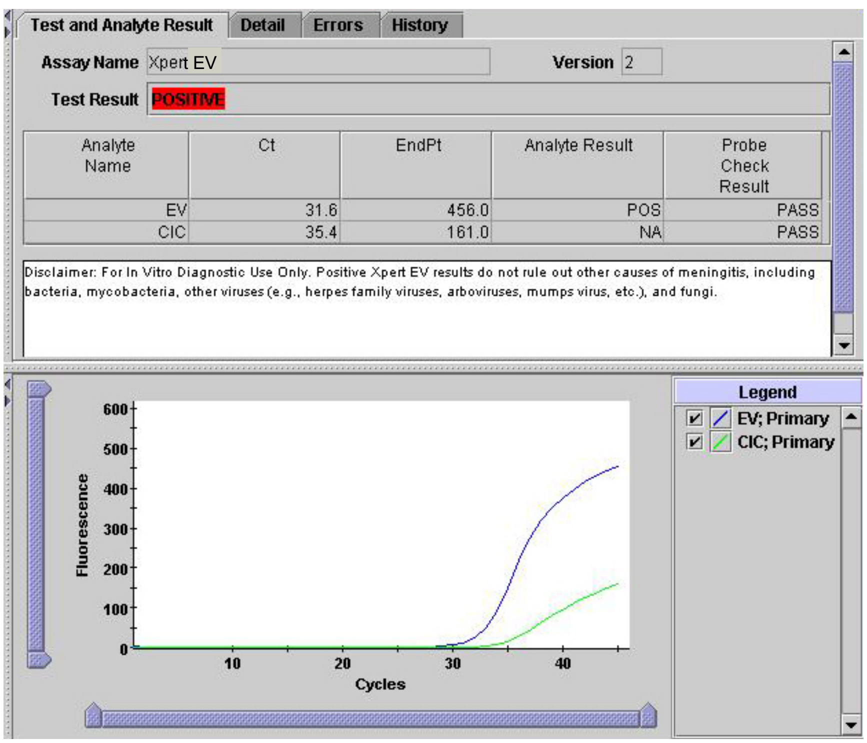


Figura 2. Risultato positivo (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC è visualizzato come CIC)

NEGATIVE (NEGATIVO) (Figura 3)

L'acido nucleico bersaglio dell'EV non viene rilevato, ma l'SPC soddisfa i criteri di accettazione (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC

è visualizzato come CIC):

- EV: NEG
- CIC (SPC/IC): PASS
- Probe Check: PASS
- **I risultati negativi di Xpert EV non escludono altre cause di meningite, ma che l'enterovirus non è stato rilevato.**

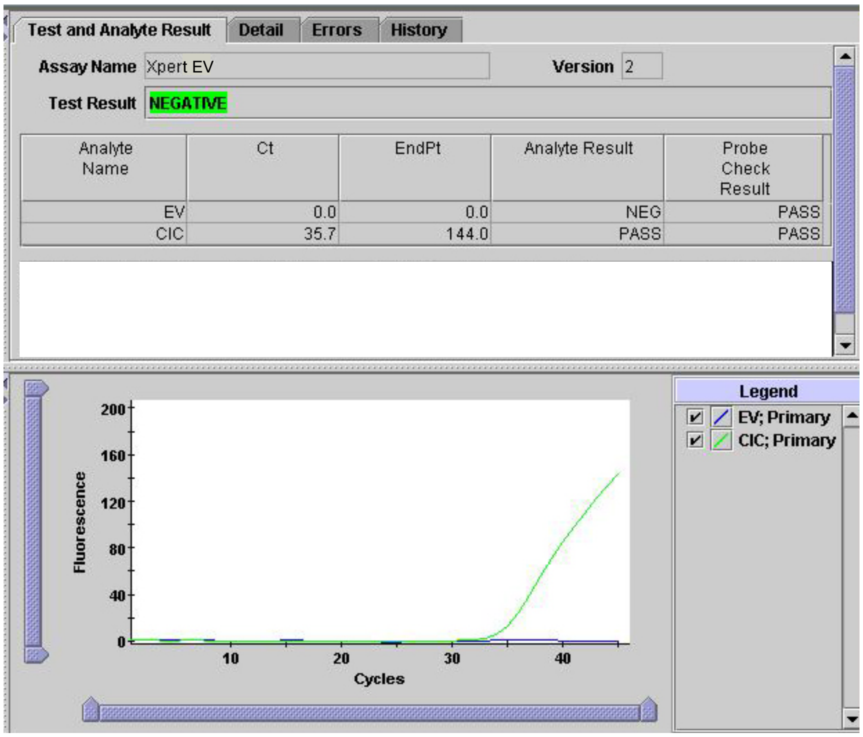


Figura 3. Risultato negativo (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC è visualizzato come CIC)

INVALID (NON VALIDO) (Figura 4)

La presenza o assenza dell'acido nucleico bersaglio dell'EV non può essere determinata, ripetere l'analisi con campioni supplementari. L'SPC/IC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non è stato elaborato correttamente o la PCR è inibita (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC è visualizzato come CIC):

- EV: INVALID
- CIC (SPC/IC): FAIL
- Probe Check: PASS

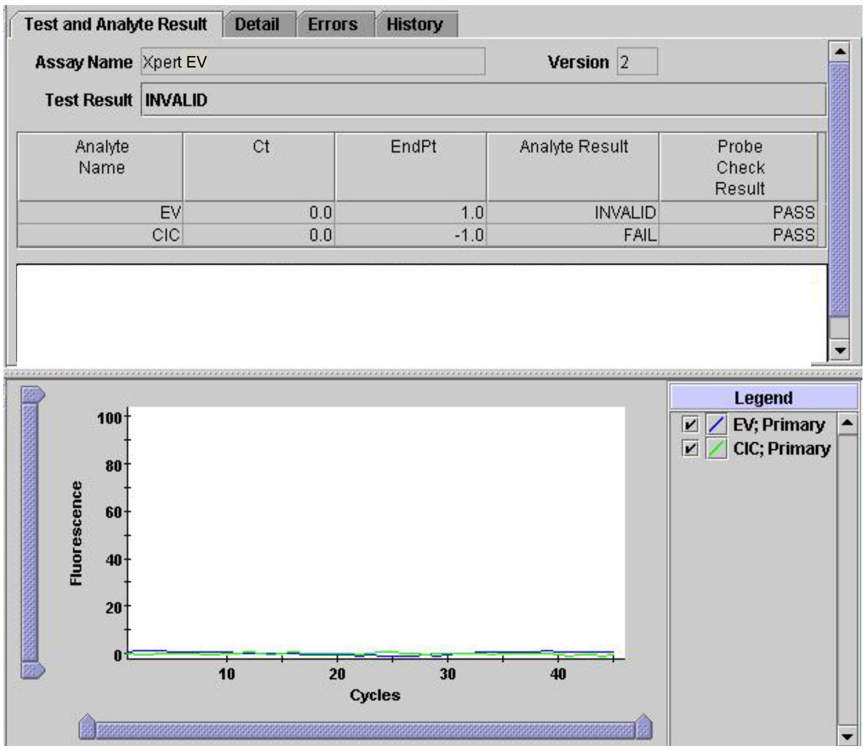


Figura 4. Risultato non valido (finestra GeneXpert® Dx System – **View Results** (Visualizza risultati), l'SPC/IC è visualizzato come CIC)

ERROR (ERRORE)

La presenza o assenza dell'acido nucleico bersaglio dell'EV non può essere determinata, ripetere l'analisi con campioni supplementari. Il controllo per il controllo sonda non è riuscito probabilmente a causa del riempimento scorretto della provetta di reazione, è stato rilevato un problema di integrità della sonda o il saggio è stato interrotto:

- EV: NO RESULT
- CIC (SPC/IC): NO RESULT
- Probe Check: FAIL

NO RESULT (NESSUN RISULTATO)

La presenza o assenza dell'acido nucleico bersaglio dell'EV non può essere determinata, ripetere l'analisi con campioni supplementari. Sono stati raccolti dati insufficienti per produrre un risultato del test (per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi in corso):

- EV: NO RESULT
- CIC (SPC/IC): NO RESULT
- Probe Check: NA

Motivi per ripetere il saggio

Ripetere il saggio con un campione fresco, se vengono generati i seguenti risultati:

- Un risultato INVALID (NON VALIDO) indica che i controlli SPC/IC non sono riusciti. Il campione non è stato elaborato correttamente o la PCR è inibita.
- Un risultato ERROR (ERRORE) indica che il controllo per il controllo sonda non è riuscito e il saggio è stato interrotto probabilmente a causa del riempimento scorretto della provetta di reazione, è stato rilevato un problema di integrità della sonda o sono stati superati i limiti della pressione massima.
- Un risultato NO RESULT (NESSUN RISULTATO) indica che sono stati raccolti dati insufficienti. Per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi in corso.

Limitazioni

- I risultati del saggio Xpert EV devono essere interpretati contestualmente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico. Un risultato positivo del saggio Xpert EV non esclude la presenza di un altro batterio patogeno nel liquido cerebrospinale. Come con qualsiasi saggio molecolare, i risultati falsi positivi sono sempre possibili. In letteratura sono stati riportati casi rari di meningite batterica-virale.[7, 8, 9]
- Le prestazioni del saggio Xpert EV sono state validate con le procedure fornite esclusivamente in questo foglio illustrativo e con Cepheid GeneXpert® Dx System. Non devono essere apportate modifiche a queste procedure, poiché possono alterare le prestazioni dell'analisi.
- Il saggio Xpert EV è destinato esclusivamente al rilevamento dell'enterovirus. I risultati negativi dell'analisi non escludono la presenza di enterovirus. Questa analisi non esclude la possibilità di meningite erpetica o meningite micotica; sono necessarie analisi supplementari per escludere queste infezioni.

ATTENZIONE: come con altre procedure diagnostiche, i risultati ottenuti con il saggio Xpert EV devono essere utilizzati solo come integrazione all'osservazione clinica e alle altre informazioni disponibili al medico. I risultati positivi di Xpert EV non escludono altre cause di meningite, compresi batteri, micobatteri, altri virus (per esempio, virus della famiglia degli herpes, arbovirus, virus della parotite, ecc.) e funghi.

Sostanze interferenti

Sono stati condotti studi con potenziali sostanze interferenti riscontrate nel liquido cerebrospinale. Le sostanze analizzate erano globuli bianchi, proteine, sangue intero ed emoglobina. Il contenuto dei globuli bianchi (WBC) è stato analizzato utilizzando leucociti (cellule umane di leucemia K562) aggiunti al liquido cerebrospinale.

Per affrontare le potenziali interferenze da punture con sangue, sono stati analizzati i campioni di liquido cerebrospinale umano contaminati con vari livelli (fino a 125.000 RBC/mm^3) di sangue.

Gli intervalli di concentrazione e le sostanze interferenti rilevate nel liquido cerebrospinale normale sono indicati nella Tabella 1a. Sono anche indicati i potenziali intervalli rilevati nel liquido cerebrospinale durante la meningite. Ogni sostanza è stata aggiunta a livelli che potrebbero essere riscontrati in pazienti normali o con meningite.

Tutte le analisi sono state eseguite con LCS aggiunto al sierotipo di enterovirus CVA9 a 80 $TCID_{50}$/mL (~3x LOD).

Tabella 1a. Campioni di sostanze endogene potenzialmente interferenti analizzate in Xpert EV.

Sostanza	Intervallo di concentrazione riscontrato nel LCS normale	Potenziale intervallo di concentrazione nel LCS (durante la meningite)	Campione analizzato con Xpert EV	Concentrazioni analizzate
Leucotici (WBC)	0 – 5 cellule/mm^3	5 – 5.000 cellule/mm^3	Cellule K562	Cellule/mm^3: 0; 3,57; 35,7; 357; 7140
Proteine LCS	13 – 40 mg/dL	15 – 217 mg/dL	BSA: IgG (rapporto 1:1)	Concentrazione di proteine mg/dL 0, 30, 300, 1.071
Sangue	Nessuno	Non applicabile	LCS umano 14 punture con sangue	Da 0% a circa 2,5% v/v sangue
Emoglobina	12 – 18 g/dL RBC (eritrociti)	Non applicabile eccetto in punture con sangue	Emoglobina (polvere ferrosa) aggiunta al LCS	HgB g/dL 0; 0,36; 0,71; 2,14; 3,6 [Rappresenta circa v/v sangue nel LCS, rispettivamente: 0%, 2,5%, 5%, 15%, 25%]

Come indicato nella Tabella 1b, sono stati ottenuti risultati positivi per enterovirus persino quando era stato introdotto nel saggio il livello più alto di sostanza potenzialmente interferente.

Tabella 1b. Risultati dello studio con sostanze endogene potenzialmente interferenti analizzate in Xpert EV.

Sostanza interferente	Concentrazione	EV C_t
Nessuna (Controllo n = 8)	Non applicabile	36,1
Proteina (n = 4)	1.071 mg/dL	38,2
Leucotici (WBC) (n = 4)	7.140 cellule/mm^3	37,2
Puntura con sangue, campione 1	2,5% v/v sangue	35,9
Puntura con sangue, campione 2	2,5% v/v sangue	35,0
Puntura con sangue, campione 3	2,5% v/v sangue	35,3
Emoglobina (n = 4)	3,6 g/dL	36,9

Caratteristiche sulle prestazioni

Prestazioni cliniche

Le caratteristiche sulle prestazioni del saggio Xpert EV sono state determinate in uno studio sperimentale in più laboratori, presso sei istituti.

Per essere arruolato nello studio un paziente deve essere stato sottoposto a rachicentesi per i sintomi della meningite ed aver eseguito un test EV e/o la coltura virale prescritti dal medico. Il paziente deve avere sufficiente volume in eccesso di liquido cerebrospinale (superiore o uguale a 0,5 mL) e aver fornito il consenso scritto, se richiesto. I campioni dei pazienti sono stati esclusi, se il liquido cerebrospinale per il test dell'acido nucleico era stato centrifugato o se i saggi per la determinazione della realtà clinica non erano stati eseguiti nello stesso ciclo di congelamento-scongelamento del campione. È anche stata presa in considerazione l'anamnesi clinica dei pazienti: segni e sintomi clinici; giorni trascorsi dalla comparsa dei sintomi; temperatura massima; storia del contatto; eritrociti (RBC), leucotici (WBC) e formula leucocitaria nel LCS; glucosio e proteina totale nel LCS; coltura batterica e colorazione gram del LCS; glicemia; coltura virale da altri campioni, se disponibile.

Un paziente veniva definito come affetto da meningite EV (diagnosi clinica), se erano soddisfatti i seguenti criteri: evidenza clinica coerente con la meningite, risultati di laboratorio per colorazione gram del LCS, coltura batterica del LCS, glucosio nel LCS, rapporto glicemia-LCS, concentrazione di proteine totali nel LCS, conta leucocitaria nel LCS e rilevamento di un genoma EV nel liquido cerebrospinale e/o coltura EV di LCS positiva.

Inizialmente sono stati inviati per l'arruolamento 475 pazienti. 41 pazienti non hanno soddisfatto i criteri di inclusione dello studio e sono stati successivamente eliminati dall'analisi lasciando 434 soggetti analizzabili, dei quali 255 hanno avuto risultati da tutti i test descritti sopra.

Tabella 2a. Campioni clinici prospettici valutati contro "diagnosi clinica"

È stato arruolato un totale di 199 pazienti prospettici idonei, 133 pazienti avevano i risultati dei 6 laboratori per la valutazione della "realtà clinica". La sensibilità e la specificità cliniche per Xpert EV sono illustrate nella tabella riportata sotto.

		Diagnosi clinica[1]	
		+	-
Xpert EV	+	26	3
	-	1	103
Totali		**27**	**106**

Sensibilità clinica: 96,3% (26/27); 95% CI 81,0 – 99,9%
Specificità clinica: 97,2% (103/106); 95% CI 91,9 – 99,4%

Tabella 2b. Campioni clinici depositati, raccolti in maniera prospettica, valutati contro "diagnosi clinica"

È stato arruolato un totale di 235 pazienti retrospettivi idonei, 122 pazienti avevano i risultati dei 6 laboratori per la valutazione della "realtà clinica". La sensibilità e la specificità cliniche per Xpert EV sono illustrate nella tabella riportata sotto.

		Diagnosi clinica[1]	
		+	-
Xpert EV	+	23	3
	-	0	96
Totali		**23**	**99**

[1] Un paziente veniva definito come affetto da meningite EV (diagnosi clinica), se erano soddisfatti i seguenti criteri: evidenza clinica coerente con la meningite, risultati di laboratorio per colorazione gram del LCS, coltura batterica del LCS, glucosio nel LCS, rapporto glicemia-LCS, concentrazione di proteine totali nel LCS, conta leucocitaria nel LCS e rilevamento di un genoma EV nel liquido cerebrospinale o coltura EV di LCS positiva.

Sensibilità clinica: 100% (23/23); 95% CI 85,2 – 100%
Specificità clinica: 97,0% (96/99); 95% CI 91,4 – 99,4%

Tabella 2c. Prestazioni cliniche del saggio Xpert EV con riferimento alla "diagnosi clinica" per età.

Ciascuno dei 133 campioni clinici prospettici e 122 campioni clinici depositati, raccolti in maniera prospettica, sono stati raggruppati per età. La sensibilità e la specificità cliniche di ogni gruppo di età sono illustrate nella tabella riportata sotto.

	Campioni clinici prospettici		Campioni clinici depositati, raccolti in maniera prospettica	
Età	**Sensibilità clinica**	**Specificità clinica**	**Sensibilità clinica**	**Specificità clinica**
Neonati (più giovani di 2 mesi)	100,0% (14/14)	96,0% (24/25)	100,0% (4/4)	90,0% (18/20)
Bambini (da 2 mesi a 17 anni)	92,3% (12/13)	97,2%(69/71)	100,0 (14/14)	98,1% (51/52)
Adulti (18 anni e più vecchi)	(0/0)	100,0% (10/10)	100,0% (5/5)	100,0% (27/27)
Complessivi	96,3% (26/27)	97,2% (103/106)	100,0% (23/23)	97,0% (96/99)

Sono state eseguite colture virali nel 73,7% (320/434) dei campioni idonei; i restanti avevano liquido cerebrospinale insufficiente per la coltura. I campioni di liquido cerebrospinale di 263 soggetti con sufficiente volume in eccesso sono stati inviati a un laboratorio centrale designato per la coltura virale. Inoltre, le colture virali per 114 campioni dei pazienti sono state eseguite presso i centri di arruolamento. A 57 di questi 114 soggetti sono state eseguite le colture virali sia presso i centri di arruolamento sia presso il laboratorio centrale. 56 soggetti su 57 avevano risultati colturali concordanti, un soggetto aveva risultati colturali locali e centrali discrepanti.

Il laboratorio centrale ha usato flaconi di Super E-Mix Shell per la coltura virale e le cellule sono state marcate con anticorpo pan-enterovirus. Le cellule che erano positive per l'anticorpo pan-enterovirus sono state successivamente marcate con anticorpo di immunofluorescenza indiretta per l'identificazione dell'enterovirus. Ogni centro di arruolamento ha usato la propria procedura standard per la coltura virale.

Tabella 3a. Campioni clinici prospettici valutati contro la coltura virale

Dei 199 campioni prospettici idonei, 131 avevano risultati della coltura virale. Non ci sono stati risultati discrepanti relativi ai test su colture virali eseguiti nei centri di arruolamento e nel laboratorio centrale. Le concordanze positive e negative tra Xpert EV e coltura virale sono illustrate nella tabella riportata sotto.

		Coltura virale	
		+	**–**
Xpert EV	+	8	13
	–	0	110
Totali		8	123

Concordanza positiva: 100,0% (8/8) 95% CI 63,1 – 100,0%
Concordanza negativa: 89,4% (110/123) CI 82,65 – 94,3%

Tabella 3b. Campioni clinici depositati, raccolti in maniera prospettica, valutati contro coltura virale

Dei 235 campioni retrospettivi idonei, 211 avevano risultati della coltura virale. Le concordanze positive e negative tra Xpert EV e coltura virale sono illustrate nella tabella riportata sotto.

		Coltura virale	
		+	-
Xpert EV	+	22	35
	-	1	153
Totali		23	188

Concordanza positiva: 95,7% (22/23) 95% CI 78,1 – 99,9%
Concordanza negativa: 81,4% (153/188) 95% CI 75,1 – 86,7%

Tabella 4. Valori previsti per Xpert EV nella popolazione con segni e sintomi coerenti con la meningite

I 434 pazienti idonei sono raggruppati per età e sesso; il numero e la percentuale di casi positivi sono calcolati e illustrati nella tabella riportata sotto.

		Risultato Xpert EV		
Intervallo di età (anni)	Sesso	**Positivo n (%)**	**Negativo n (%)**	**Totale**
< 1	M	34 (29,3)	82 (70,7)	116
	F	26 (28,3)	66 (71,7)	92
1 – 5	M	8 (25,0)	24 (75,0)	32
	F	3 (11,1)	24 (88,9)	27
6 – 10	M	3 (31,4)	24 (68,6)	35
	F	3 (17,6)	14 (82,4)	17
11 – 15	M	8 (33,3)	16 (66,7)	24
	F	3 (15,0)	17 (85,0)	20
16 – 21	M	3 (20,0)	12 (80,0)	15
	F	3 (25,0)	9 (75,0)	12
>21	M	2 (10,0)	18 (90,0)	20
	F	3 (12,5)	21 (87,5)	24
Totale		107 (24,7)	327 (75,3)	434

Reattività analitica/test di sierotipi di enterovirus

Sono stati analizzati complessivamente 60 sierotipi di enterovirus con il saggio Xpert EV. Le diluizioni di stock virale sono state eseguite in repliche di 3 per ogni sierotipo al LOD presunto. Le diluizioni sono state eseguite in un un pool di campioni umani negativi EV. La sensibilità analitica stimata è illustrata nella Tabella 5 riportata sotto.

Tabella 5. Sensibilità analitica stimata.

Sessanta dei sierotipi sono stati analizzati e il valore $TCID_{50}$/mL stimato che può essere rilevato in questi sierotipi è illustrato nella tabella riportata sotto.

Specie	Sierotipo	$TCID_{50}$/mL stimato
A	Coxsackie A3	5,01
A	Coxsackie A5	12,59
A	Coxsackie A6	12,59
A	Coxsackie A7	3,33
A	Coxsackie A10	2,81
A	Coxsackie A12	19,95
A	Coxsackie A14	0,10
A	Coxsackie A16	0,002
A	EV 71	0,16
B	Coxsackie A9	20,00
B	Coxsackie B1	4,00
B	Coxsackie B2	0,20
B	Coxsackie B3	0,028
B	Coxsackie B4	0,40
B	Coxsackie B5	0,04
B	Coxsackie B6	0,01
B	Echo 1	0,10
B	Echo 2	0,032
B	Echo 3	200,00
B	Echo 4	0,00032
B	Echo 5	0,032
B	Echo 6	200,00
B	Echo 7	2,00
B	Echo 8	0,10
B	Echo 9	2,00
B	Echo 11	40,00
B	Echo 12	1,58
B	Echo 13	0,01
B	Echo 14	0,0005
B	Echo 15	0,0032
B	Echo 16	0,0005
B	Echo 17	0,05
B	Echo 18	0,0002
B	Echo 19	2,51
B	Echo 20	0,032
B	Echo 21	1,00
B	Echo 24	0,02
B	Echo 25	0,50
B	Echo 26	0,032
B	Echo 27	0,00032
B	Echo 29	5,01
B	Echo 30	0,01
B	Echo 31	0,0032
B	Echo 32	0,10
B	Echo 33	0,05
B	EV 69	0,0002
C	Coxsackie A11	0,11
C	Coxsackie A13	13,27
C	Coxsackie A15	0,0032
C	Coxsackie A17	1,58
C	Coxsackie A18	0,02
C	Coxsackie A19	0,03
C	Coxsackie A20	0,002
C	Coxsackie A21	0,03
C	Coxsackie A22	0,02
C	Coxsackie A24	0,10
D	EV 68	199,53
D	EV 70	2,00
Poliovirus	Poliovirus 1	2,00
Poliovirus	Poliovirus 2	0,40
Poliovirus	Poliovirus 3	20,00

Specificità analitica

Le sequenze dei primer e delle sonde utilizzate nel saggio Xpert EV non rilevano l'acido nucleico estratto dai seguenti organismi che sono, notoriamente, la causa dei sintomi della meningite: EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, AdV-2, morbillo, parotite, Parainfluenza 1-3, Influenza A, Influenza B, VZV, CMV, streptococco di gruppo B, *Haemophilus influenzae* B, *H. influenzae* non-B, *Escherichia coli, Neisseria meningitides, Citrobacter freundii,* e *Citrobacter koseri,* né il saggio Xpert EV ha generato alcun amplicon. rilevabile quando gli "organismi interi" dei patogeni elencati sono stati elaborati tramite la cartuccia Xpert EV. La tabella seguente presenta gli organismi analizzati e la concentrazione per ogni organismo analizzato.

Tabella 6. Specificità analitica per il saggio Xpert EV.

Gli organismi interi sono stati analizzati per la specificità nel saggio Xpert EV e le concentrazioni degli organismi analizzati sono illustrate nella tabella riportata sotto.

Organismo	Nr. organismi/analisi
HHV-6	3,1 x 10^6 particelle
HHV-7	1,4 x 10^7 particelle
CMV	700 $TCID_{50}$
EBV	140 $TCID_{50}$
HSV-1	1,4 x 10^5 $TCID_{50}$
HSV-2	1,4 x 10^5 $TCID_{50}$
AdV-2	1,4 x 10^{12} $TCID_{50}$
Morbillo	700 $TCID_{50}$
Parotite	1,4 x 10^4 $TCID_{50}$
Parainfluenza 1	1,4 x 10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 2	7 x 10^3 $TCID_{50}$
Parainfluenza 3	1,4 x 10^4 $TCID_{50}$
Influenza A	3,5 x 10^4 $TCID_{50}$
Influenza B	3,5 x 10^4 $TCID_{50}$
VZV	14 $TCID_{50}$
Streptococco di gruppo B	7 x 10^6 cellule
H. influenzae B	7 x 10^6 cellule
H. influenzae non B	7 x 10^5 cellule
E.coli	7 x 10^6 cellule
N. meningitides	7 x 10^6 cellule
C. freundii	7 x 10^6 cellule
C. koseri	7 x 10^6 cellule

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica o limite di rilevamento (LOD) è definita come la concentrazione minima o la quantità di analita che, tramite analisi di laboratorio, è stata dimostrata essere riproducibilmente distinta da un campione negativo a un intervallo di confidenza del 95%. Le diluizioni sono state eseguite in un pool di campioni umani negativi EV. Per la determinazione della confidenza statistica del LOD, sono state eseguite repliche di 20, insieme a 20 campioni negativi EV. I campioni eseguiti erano Virus coxsackie A6 (CVA6), Virus coxsackie A9 (CVA9), Virus coxsackie A17 (CVA17), Enterovirus 70 (EV70) e Poliovirus 1 (PV1). Non tutti i 63 sierotipi sono stati eseguiti in numeri statisticamente significativi, poiché i siti di legame dei primer e delle sonde sono conservati in tutti i sierotipi e la lunghezza dell'amplicon è la stessa per tutti i sierotipi, così ci si sarebbe aspettati la stessa efficienza di amplificazione per tutti i sierotipi. I cinque sierotipi indicati sopra sono stati selezionati per rappresentare ciascuna delle specie di enterovirus CVA6 (A), CVA9 (B), CVA17 (C), EV70 (D) e PV1 (poliovirus).

Tabella 7. Limite di rilevamento per cinque (5) sierotipi.

Il LOD dei cinque (5) sierotipi, uno da ciascuna delle specie di enterovirus, è illustrato nella tabella riportata sotto.

Sierotipo	Limite di rilevamento ($TCID_{50}$/mL)
CVA9	80,0
EV70	1,3
PV1	4,0
CVA17	1,0
CVA6	33,0

Riproducibilità

La riproducibilità è stata valutata in uno studio multicentrico, condotto in cieco, con l'utilizzo di un pannello di precisione costituito da quattro campioni. Tre laboratori hanno analizzato ciascun pannello tre volte al giorno per 10 giorni di test, per un totale di 90 risultati per campione del pannello. Il pannello di precisione comprendeva un campione negativo e tre campioni positivi, ciascuno con un sierotipo EV specifico aggiunto a LCS sintetico a una concentrazione vicina al limite di rilevamento.

Tabella 8. Riepilogo dei risultati di riproducibilità.

La percentuale di concordanza, i valori Ct medi per ogni concentrazione, le deviazioni standard associate, la percentuale del coefficiente di variazione per tra giorno e tra laboratorio per lo studio multicentrico di riproducibilità sono illustrati nella tabella riportata sotto.

Nr. di campioni correttamente classificati					Tra giorno		Tra laboratorio		Totale	
Sierotipo ($TCID_{50}$/mL)	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3	Ct EV medio	DS	% CV	DS	% CV	DS	% CV
Negativo	30/30	30/30	30/30							
CVA6 (134)	30/30	30/30	29/29[1]	35,0	0,343	0,98%	0,175	0,50%	1,101	3,15%
CVA9 (320)	30/30	30/30	30/30	34,4	0	0,00%	0	0,00%	0,61	1,77%
CVA17 (3)	30/30	30/30	29/29[1]	33,8	0	0,00%	0	0,00%	0,414	1,22%
Concordanza totale	120/120	120/120	118/118							
% concordanza	100,00%	100,00%	100,00%							

[1] Due campioni non hanno restituito alcun risultato GeneXpert®.

Per mettere in risalto ulteriormente il sistema, è stato eseguito un secondo studio. Uno studio interno di riproducibilità è stato condotto per quattro giorni diversi su più strumenti GeneXpert® (31) e moduli ICORE (121). Due sottotipi di virus intero rappresentativi (Virus coxsackie CVA9 ed Enterovirus EV70) sono stati aggiunti a LCS negativo umano per creare campioni simulati a 2 x LOD e 4 x LOD. Il campione negativo è stato analizzato 20 volte mentre i due campioni positivi a duediverse concentrazioni sono stati analizzati cinque (5) volte al giorno. Il risultato dei campioni totali analizzati è stato "Invalid" (Non valido) per due campioni e "No Result" (Nessun risultato) per tre campioni, per le definizioni di controllo del software dello strumento. 155 dei 157 risultati refertabili sono stati correttamente classificati.

Tabella 9. Riepilogo dei risultati del secondo studio di riproducibilità

Il livello di concordanza, i valori Ct medi per ogni concentrazione, le deviazioni standard associate e la percentuale del coefficiente di variazione per ogni giorno sono illustrati nella tabella riportata sotto.

ID del campione		Concordanza totale – risultati C_t					% concordanza totale
		Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Tutti i giorni	
Negativo	Concordanza totale	20/20	18/18[1]	20/20	20/20	78/78	100%
	Media	NA	NA	NA	NA	NA	
	DS	NA	NA	NA	NA	NA	
	% CV	NA	NA	NA	NA	NA	
CA9 2X LOD	Concordanza totale	4/5[2]	5/5	4/5[2]	5/5	18/20	90%
	Media	36,65	36,54	36,53	36,54	36,56	
	DS	0,56	0,46	0,21	0,69	0,48	
	% CV	1,53%	1,26%	0,57%	1,89%	1,31%	
CA9 4X LOD	Concordanza totale	5/5	5/5	5/5	4/4[3]	19/19	100%
	Media	34,98	35,56	35,52	35,03	35,28	
	DS	0,53	0,67	0.7	0,3	0,6	
	% CV	1,52%	1,88%	1,97%	0,86%	1,70%	
EV70 2X LOD	Concordanza totale	5/5	5/5	5/5[4]	5/5	20/20	100%
	Media	37,38	37,3	37,55	36,88	37,2	
	DS	1,78	0,74	2,01	0,81	1,3	
	% CV	4,76%	1,98%	5,35%	2,20%	3,49%	
EV70 4X LOD	Concordanza totale	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100%
	Media	36,50	36,60	36,12	35,94	36,29	
	DS	0,58	0,97	0,29	0,84	0,72	
	% CV	1,59%	2,65%	0,80%	2,34%	1,98%	
Numero di strumenti usati		10	11	10	10	31	
Numero di moduli usati		40	41	41	40	121	

[1] Corse totali = 21, 2 – Nessun risultato, 1 – Non valido
[2] Corse totali = 5, 1 risultato negativo anziché positivo
[3] Corse totali = 5, 1 – Non valido
[4] Corse totali = 6, 1 – Nessun risultato

Riferimenti bibliografici

1. Viral ("Aseptic") Meningitis. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases: Respiratory and Enteric Viruses Branch. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm (accessed April 11, 2006).

2. Rotbart HA. Viral meningitis. Semin Neurol. 2000; 20(3): 277-92.

3. Romero JR, Rotbart HA. Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003: 1427-1438.

4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, et al. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. Pediatric Infectious Disease Journal. 2002; 21: 283-6.

5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

7. Wright HT, McAllister RM, Ward R. "Mixed" Meningitis: Report of a Case with Isolation of Haemophilus Influenzae Type B and ECHO Virus Type 9 from the Cerebrospinal Fluid. New England Journal of Medicine. 1962; 267: 142-144.

8. Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacteria and viral pathogens from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal. 1988; 7: 552-556.

9. Dronkert ML, Ketel AG, de Groot R. Simultaneous occurrence of group B Streptococcus and echovirus 20. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 915.

Assistenza

Per ricevere assistenza, contattare Cepheid a uno dei seguenti recapiti. Quando si contatta l'Assistenza tramite telefono o posta elettronica, accertarsi di fornire il numero di serie dello strumento e l'ID del lotto reagenti.

Nord America

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +1.888.838.3222

E-mail: techsupport@cepheid.com

È possibile contattare telefonicamente l'Assistenza tecnica Cepheid dal lunedì al venerdì, dalle 6 alle 17 (Pacifico).

Unione Europea

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +33.563.82.53.19

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Altri Paesi

Contattare il rappresentante Cepheid locale.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
REF	Numero di catologo
IVD	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Non riutilizzare
	Attenzione: consultare la documentazione allegata
	Produttore
	Contiene quantità sufficiente per <n> analisi
	Data di scadenza
CONTROL	Controllo
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
+2 °C +28	Limitazione della temperatura
	Rischio biologico

Produttore

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Telefono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Rappresentante autorizzato

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD